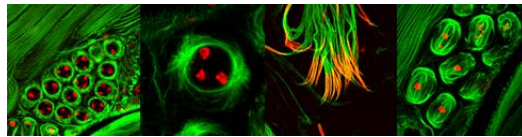


Condensin I in Meiose:
Charakterisierung einer essentiellen Rolle für die männliche
Keimzellbildung von *D. melanogaster*



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik
und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Kristina Seel, M. Sc.

aus Naila

Bayreuth, 2017

Condensin I in Meiose:
Charakterisierung einer essentiellen Rolle für die männliche
Keimzellbildung von *D. melanogaster*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik
und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Kristina Seel, M. Sc.

aus Naila

Bayreuth, 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2012 bis Dezember 2017 in Bayreuth am Lehrstuhl für Genetik unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. Stefan Heidmann angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin/ eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat).

Dissertation eingereicht am: 19.12.2017

Zulassung durch das Leitungsgremium: 15.01.2018

Wissenschaftliches Kolloquium: 24.04.2018

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Stefan Heidmann (Gutachter)

Prof. Dr. Gerrit Begemann (Gutachter)

Prof. Dr. Benedikt Westermann (Vorsitz)

Prof. Dr. Olaf Stemmann

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
1 Einleitung	1
1.1 Der eukaryontische Zellzyklus.....	1
1.2 Prinzipien der Mitose.....	3
1.3 Prinzipien der Meiose	4
1.3.1 Meiose in <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.3.2 Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.3.3 Besonderheiten der männlichen Meiose in <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.4 Chromosomenkondensation	11
1.5 Condensin	13
1.5.1 Aufbau und Struktur von Condensin-Komplexen.....	14
1.5.2 Subzelluläre Lokalisation und Dynamik der Condensin-Komplexe.....	17
1.5.3 Mechanismen der Chromatin-Strukturierung durch Condensin.....	19
1.5.4 Regulation von Condensin	24
1.5.5 Funktionsspektrum der Condensin-Komplexe	26
1.5.6 Medizinische Relevanz der Condensin-Komplexe.....	29
1.5.7 Besonderheiten der Condensin-Komplexe in <i>Drosophila melanogaster</i>	30
1.6 Zielsetzung.....	32
2 Ergebnisse	34
2.1 Etablierung der CRISPR/Cas-Methode zur gezielten Genommanipulation in <i>D. melanogaster</i>	34
2.1.1 Validierung und Optimierung eines Screening-Verfahrens für die CRISPR/Cas-basierte Genommodifikation in <i>D. melanogaster</i>	34
2.1.2 CRISPR/Cas-vermittelter <i>EGFP-knockin</i> im endogenen Barren Locus	38
2.2 Lokalisation und Dynamik des Condensin I-Komplexes in der männlichen Meiose von <i>D. melanogaster</i>	42
2.2.1 Condensin I-Untereinheiten lokalisieren am meiotischen Chromatin	42

2.2.2	Der meiotischen Chromatinassoziation von Condensin I liegen dynamische Wechselwirkungen zugrunde	46
2.2.3	Aurora B Kinase spielt eine untergeordnete Rolle bei der meiotischen Chromatinassoziation von Condensin I	49
2.3	Funktionelle Charakterisierung von Condensin I in der männlichen Meiose von <i>D. melanogaster</i>	53
2.3.1	Charakterisierung des RNAi-vermittelten Abbaus der mRNA von Condensin-Untereinheiten in der Keimbahn	53
2.3.2	Die Inaktivierung von Condensin I führt zu einer Reduktion der männlichen Fertilität	59
2.3.3	Die Inaktivierung von Condensin I hat eine aberrante Chromosomensegregation zur Folge	62
2.3.4	Fehler bei der meiotischen Chromosomensegregation führen zur Entstehung aneuploider Keimzellen	65
2.3.5	Die Inaktivierung von Condensin I beeinträchtigt die Morphologie von Spermienkernen	73
2.3.6	Die Inaktivierung von Condensin I hat einen frühzeitigen Zerfall der gebündelten Spermatiden während der Spermiogenese zur Folge	74
2.3.7	Proteolytische Spaltung der Condensin I-Untereinheit Barren während der Spermatogenese in <i>D. melanogaster</i>	75
2.3.8	Proteasomaler Abbau von Barren bestätigt den Einfluss von Condensin I auf die meiotische Chromosomensegregation und männliche Fertilität	78
3	Diskussion	82
3.1	Vorteile der CRISPR/Cas-vermittelten Genommodifikation	82
3.2	Erzeugung EGFP-markierter Condensin-Untereinheiten durch CRISPR/Cas-vermittelte Genommanipulation	84
3.3	Lokalisationsprofil von Condensin I-Untereinheiten in Meiose	88
3.4	Dynamik der meiotischen Chromatinassoziation von Condensin I	89
3.5	Die Rolle von Aurora B Kinase bei der Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose	91

3.6	Die Rolle von Condensin I bei der meiotischen Chromosomensegregation während der männlichen Keimzellbildung in <i>D. melanogaster</i>	93
3.7	Der Einfluss von Condensin I auf die Integrität des Spermienchromatins	99
4	Material und Methoden	101
4.1	Material	101
4.1.1	Chemikalien und Reagenzien	101
4.1.2	Bakterienstämme	101
4.1.3	Plasmide	101
4.1.4	DNA-Oligonukleotide	102
4.1.5	Antikörper	105
4.2	Methoden in Umgang mit <i>D. melanogaster</i>	105
4.2.1	Fliegenstämme	105
4.2.2	Standardmethoden	107
4.2.3	Allgemeine genetische Methoden im Umgang mit <i>D. melanogaster</i>	107
4.2.3.1	Balancierchromosomen	107
4.2.3.2	Keimbahntransformation von <i>D. melanogaster</i> -Embryonen durch Mikroinjektion und anschließende Kartierung von Transgeninsertionen	108
4.2.3.3	Gal4/UAS-System	109
4.2.3.4	RNA-Interferenz in <i>D. melanogaster</i>	109
4.2.3.5	DeGradFP (<i>Degrade green fluorescent protein</i>)-System	110
4.2.3.6	TEV-Protease-System	110
4.2.3.7	Flp/FRT-System	110
4.2.3.8	Männlicher Fertilitätstest	111
4.2.3.9	<i>Nondisjunction</i> -Analyse	111
4.2.4	Spezielle Methoden im Umgang mit <i>D. melanogaster</i>	112
4.2.4.1	Primärkultur von isolierten <i>D. melanogaster</i> -Spermatozyten	112
4.2.4.2	Inhibitorbehandlung von kultivierten Spermatozyten	113
4.2.4.3	Präparation von Hoden und Ovarien aus adulten <i>D. melanogaster</i> -Fliegen	113
4.2.4.4	Präparation von Samenblasen aus adulten <i>D. melanogaster</i> -Männchen	113
4.2.4.5	Embryonenkollektion	113
4.2.4.6	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>D. melanogaster</i> -Geweben	114

4.2.4.7	Immunfluoreszenzfärbung von adulten <i>D. melanogaster</i> -Hoden	114
4.2.4.8	Quetschpräparate von adulten <i>D. melanogaster</i> -Hoden mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung	115
4.2.4.9	Quetschpräparate von adulten <i>D. melanogaster</i> -Hoden mit anschließender Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	115
4.2.4.10	Herstellung von DNA-Sonden für FISH	116
4.2.4.11	Isolation genomischer DNA aus adulten Fliegen	117
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	117
4.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	117
4.3.2	Coomassie Färbung	117
4.3.3	Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen	118
4.3.4	Kopplung von Proteinen an CnBr-aktivierte Sepharose	118
4.3.5	Affinitätsreinigung von anti-EGFP Antikörpern	118
4.3.6	Western Blot und immunologischer Nachweis	119
4.4	Molekularbiologische Methoden	120
4.4.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	120
4.4.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	120
4.4.1.2	PCR-Mutagenese	120
4.4.1.3	Restriktionshydrolyse	121
4.4.1.4	Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten	122
4.4.1.5	Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten	122
4.4.1.6	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	122
4.4.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	123
4.4.1.8	Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung.....	123
4.4.1.9	Agarosegelelektrophorese	123
4.4.1.10	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	123
4.4.1.11	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	124
4.4.1.12	Herstellung von mRNA	124
4.4.1.13	Spezielle Klonierungsstrategien.....	124
4.5	Spezielle Methoden zur Genommanipulation mittels CRISPR/Cas	126
4.5.1	CRISPR/Cas-Technologie	126

4.5.2	chiRNA-Design	127
4.5.3	Klonierung der chiRNA pU6-chiRNA-B-E3	127
4.5.4	Klonierung der Donor-DNA pSI-CapG ^C -3'UTR-noPAM-FSV3FE	128
4.5.5	Klonierung der Donor-DNA pSI-Barren ^C -3'UTR-noPAM-FSV3FE	128
4.5.6	CRISPR/Cas-vermittelte Keimbahntransformation	129
4.6	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	130
4.6.1	Allgemeine Mikroskopiermethoden	130
4.6.2	FRAP Mikroskopie	130
4.6.3	FRAP Quantifizierung.....	130
5	Abkürzungsverzeichnis	132
6	Literaturverzeichnis	134
7	Anhang	154
8	Danksagung.....	157
9	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen.....	159

Zusammenfassung

Die fehlerfreie Verteilung des genetischen Materials während der Zellteilung ist eine fundamentale Voraussetzung, um die Genomstabilität aufrechtzuerhalten. Die ordnungsgemäße Trennung und Segregation der replizierten Chromosomen erfordert eine drastische Umorganisation des Chromatins in eine robuste Transportform. Während dieses, als Chromosomenkondensation bezeichneten Prozesses, wird das gesamte Genom einer Zelle um das 200 bis 20000-fache komprimiert und zu robusten, stäbchenförmigen Strukturen, den lichtmikroskopisch sichtbaren Chromosomen, verpackt. Die evolutionär hoch konservierten, heteropentameren Proteinkomplexe, Condensin I und Condensin II, spielen eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Chromosomenstruktur. Die beiden *Structural Maintenance of Chromosomes* (SMC)-Untereinheiten bilden zusammen mit einer Untereinheit aus der Familie der Kleisine eine dreigliedrige Ringstruktur aus, welche DNA-Stränge topologisch umschließen und dadurch intrachromosomale Verknüpfungen und Schlaufen stabilisieren kann. Die funktionelle Relevanz beider Condensin-Komplexe für die mitotische sowie meiotische Chromosomensegregation konnte in allen wichtigen Modellorganismen, darunter *D. melanogaster*, beschrieben werden. Lediglich die Rolle von Condensin I für die Spermatogenese in *Drosophila melanogaster* ist nach wie vor unklar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse und Charakterisierung potentieller Funktionen des kanonischen Condensin I-Komplexes während der männlichen Keimzellbildung in *D. melanogaster*. Um die Lokalisation spezifischer Condensin-Untereinheiten eruieren zu können, stellen Fusionen mit fluoreszierenden Proteinen ein wertvolles Instrument dar. Zu diesem Zweck wurde das kürzlich entwickelte CRISPR/Cas-System eingesetzt, um, durch präzise *knockins* an deren endogenen Genloci, *EGFP*-markierte Condensin-Allele zu erzeugen. Mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems werden Doppelstrangbrüche ortsspezifisch im Genom erzeugt und auf Basis einer DNA-Matrize durch homologe Rekombination wieder repariert. Es wurde eine zuvor etablierte Screeningstrategie validiert und dahingehend optimiert, positive Rekombinationsereignisse eindeutig und verlässlich identifizieren zu können. Durch die Integration exogener DNA-Sequenzen einschließlich konditionaler, visualisierbarer Marker wurde eine transiente, gewebespezifische Expression von EGFP in den Augen adulter Fliegen induziert. Unter

Verwendung dieser Methode wurden transgene Fliegenlinien etabliert, welche die Fluoreszenz-markierte Condensin I-spezifische Kleisin-Untereinheit Barren, sowie die assoziierte nicht-SMC-Untereinheit CapG exprimieren. Durch *in vivo* Mikroskopie primärer Spermatozyten wurde das räumlich-zeitliche Lokalisationsprofil dieser und weiterer EGFP-fusionierter Condensin-Untereinheiten in Meiose verfolgt. Die einzelnen Untereinheiten offenbaren eine transiente Assoziation mit dem meiotischen Chromatin von Prometaphase bis Anaphase. *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Experimente deuten daraufhin, dass lediglich eine Subfraktion der Condensin-Komplexe stabil mit dem Chromatin assoziiert, während ein maßgeblicher Anteil dynamisch mit der löslichen Proteinfraction ausgetauscht wird. Anders als in Mitose, scheint die Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose nicht oder nur teilweise durch Aurora B Kinase-abhängige Phosphorylierung reguliert zu werden. Zur funktionellen Analyse des Condensin I-Komplexes wurde dieser konditional in der männlichen Keimbahn inaktiviert. Die RNAi-vermittelte Depletion der Condensin I-Untereinheiten SMC2, Barren und CapG führt zu einer signifikanten Reduktion der männlichen Fertilität. Der Fertilitätsverlust konnte auf eine verminderte Produktion reifer Spermien in Folge einer gestörten Keimzellbildung zurückgeführt werden. Im Verlauf beider meiotischer Teilungen treten schwerwiegende Defekte während der Chromosomensegregation auf, welche sich primär in Form von Chromatinbrücken äußern und zu Aneuploidie der betreffenden Keimzellen führen. Durch klassische, genetische *Nondisjunction*-Analysen konnte eine erhöhte Frequenz autosomaler und gonosomaler Fehlsegregationsereignisse sowohl in Meiose I als auch Meiose II nachgewiesen werden. Konsistent damit sind Befunde, die zeigen, dass Spermienkerne nach Suppression von Condensin vermehrt durch eine abnormale Kernmorphologie und numerische Chromosomenaberrationen gekennzeichnet sind. Eine abweichende Chromosomenanzahl konnte sowohl durch Quantifizierung centromerischer Cid/CenH3-Signale als auch durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit einer gegen X-chromosomale Sequenzen gerichteten DNA-Sonde demonstriert werden. Die reduzierte männliche Fertilität nach Depletion von Condensin I wurde auch durch induzierte proteolytische Spaltung und induzierte proteasomale Degradation von Barren bestätigt. Zusammenfassend deuten diese Daten erstmals daraufhin, dass der kanonische Condensin I-Komplex eine wichtige Rolle für die Chromosomensegregation in der männlichen Meiose von *D. melanogaster* spielt.

Abstract

Condensin I in meiosis:

Characterizing an essential role for male gametogenesis of *D. melanogaster*

An error-free distribution of the genetic material during cell division represents a fundamental prerequisite to maintain genomic stability. The proper separation and segregation of the replicated chromosomes requires a drastic reorganization of the chromatin into a robust transport form. During this process, called chromosome condensation, the whole genome of a cell gets compressed 200 to 20000-fold and is packaged into solid, rod-shaped structures, the light microscopically visible chromosomes. The evolutionary highly conserved, heteropentameric protein complexes, condensin I and condensin II, play particular roles in establishing and maintaining the chromosome structure. The Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) subunits together with a member of the protein family of kleisins form a tripartite ring structure, which is able to topologically embrace DNA fibres and thus stabilize intra-chromosomal loops and linkages. The functional requirement of both condensin complexes for mitotic as well as meiotic chromosome segregation has been described for all relevant model organisms including *D. melanogaster*. Only the role of condensin I during *D. melanogaster* spermatogenesis is yet unclear.

The present study thus focuses on the analysis and characterization of potential functions of the canonical condensin I complex during *D. melanogaster* male gametogenesis. Fusions with fluorescent proteins represent a valuable tool for unraveling the localization of specific condensin subunits. For this purpose I made use of the recently developed CRISPR/Cas system to generate EGFP-fused condensin alleles through EGFP knockins precisely at their endogenous gene loci. With the aid of the CRISPR/Cas system site-specific double strand breaks are induced within the genome and subsequently repaired through homologous recombination based on a specific template DNA. I first focused on the validation and optimization of a previously established screening strategy which allows us to clearly and reliably identify positive recombination events. Through the incorporation of exogenous DNA sequences including conditional, visible markers transient and tissue-specific expression of EGFP is achieved in the eyes of adult flies. By the use of the educated method fly strains were established expressing the fluorescently labelled condensin I specific kleisin subunit Barren or the associated non-SMC subunit CapG. Employing *in vivo* microscopy the spatio-

temporal localization pattern of these and other EGFP-fused condensin subunits in meiosis was traced. The condensin I subunits display a transient association with chromatin from prometaphase until anaphase. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments indicate that only a subfraction of chromatin-bound condensin complexes stably associates with the chromatin whereas a second fraction dynamically exchanges with the soluble protein pool. In contrast to mitosis the chromatin association of condensin I seems not or only partly to be dependent on phosphorylation by Aurora B kinase. For its functional analysis the condensin I complex was conditionally inactivated in the *Drosophila* male germ line. RNAi-mediated depletion of the condensin I subunits SMC2, Barren and CapG led to a significant reduction in male fertility. The fertility loss can be ascribed to a diminished production of mature sperm as a result of a perturbed gametogenesis. Defects in chromosome segregation during both meiotic divisions lead to the formation of chromatin bridges and the production of aneuploid germ cells. Classical genetic nondisjunction assays gave evidence for an increased rate of autosomal and gonosomal missegregation during meiosis I as well as meiosis II. Consistently, fluorescence microscopic analysis revealed sperm nuclei showing an abnormal morphology as well as numerical chromosome aberrations after condensin I suppression. An abnormal number of chromosomes was confirmed through quantification of centromeric Cid/CenH3-foci as well as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) specifically targeting X-chromosomal sequences. Induced proteolytic cleavage or proteasomal degradation of Barren also leads to male infertility confirming the significance of condensin I for male meiosis. Our data indicate the faithful meiotic chromosome segregation in *D. melanogaster* males critically relies on the condensin I complex probably due to its function in shaping meiotic chromatin.

1 Einleitung

1.1 Der eukaryontische Zellzyklus

Die Grundlage für die Entstehung und den Fortbestand aller multizellulären Organismen ist die Zellteilung und -proliferation. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zellteilungen durchläuft jede Zelle eine periodische Abfolge spezifischer Ereignisse, die unter dem Begriff Zellzyklus zusammengefasst werden (Abb. 1). Die Hauptaufgabe des Zellzyklus besteht darin die Reproduktion einer Zelle zu steuern und zu koordinieren, um die genetische Kontinuität über zahlreiche Generationen hinweg zu erhalten. Die akkurate Teilung der Zelle in zwei erbgleiche Tochterzellen erfordert ein extrem hohes Maß an Präzision. Um die Integrität der Zellteilung zu gewährleisten, müssen in deren Vorfeld sukzessive verschiedene, präparative Prozesse innerhalb der Zelle stattfinden: Zellwachstum in Koordination mit der Duplikation sämtlicher zellulärer Komponenten (z. B. DNA und Organellen) und schließlich deren Verteilung auf beide neu entstehenden Tochterzellen. Entsprechend der sich ereignenden Prozesse wird der Zellzyklus in mehrere charakteristische Phasen unterteilt. Die markantesten Ereignisse finden in S(Synthese)-Phase sowie in M(Mitose)-Phase statt. Die S-Phase dient primär der DNA-Replikation, ein Vorgang, bei dem das Genom der Zelle dupliziert wird. Am Ende der Replikationsphase liegt jedes Chromosom in Form zweier identischer, als Schwesterchromatiden bezeichneter, Kopien vor, welche schließlich in der M-Phase im Rahmen der Karyokinese segregiert werden. Zwischen S- und M-Phase durchläuft die Zelle eine von zwei sogenannten *Gap*-Phasen, G1- und G2-Phase (Abb. 1). In diesen finden neben intensivem Zellwachstum viele metabolische Prozesse statt, darunter die Synthese von Proteinen, RNA sowie zahlreicher weiterer zellulärer Makromoleküle und Zellorganellen. Die *Gap*-Phasen erfüllen vorwiegend eine präparative Funktion und dienen der Bereitstellung essentieller Faktoren für die bevorstehenden Prozesse von Replikation und Mitose. Zugleich greifen in ihnen wichtige Regulationsmechanismen, durch die die Progression in die unmittelbar folgende Zellzyklusphase durch eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Signale kontrolliert wird. Als Folge ungünstiger Wachstumsbedingungen und intrinsischer inhibitorischer Signale können Zellen ausgehend von der G1-Phase in die G0-Phase eintreten. Die G0-Phase charakterisiert einen ruhenden, proliferationsinaktiven Zustand der Zelle. Einige Zelltypen zeichnen sich dadurch aus, dass diese nach ihrer vollständigen Differenzierung irreversibel in G0 persistieren (z. B. Nervenzellen), während

andere das Potential besitzen diesen als Quieszenz bezeichneten Zustand wieder zu verlassen und erneut teilungsaktiv zu werden (z. B. Lymphozyten). Die Periode zwischen zwei aufeinanderfolgenden Mitosen wird generell als Interphase bezeichnet. Diese dauert um ein Vielfaches länger als die Mitose *per se* und kann mitunter mehr als 90 % der gesamten Zeit des Zyklus einer Zelle beanspruchen.

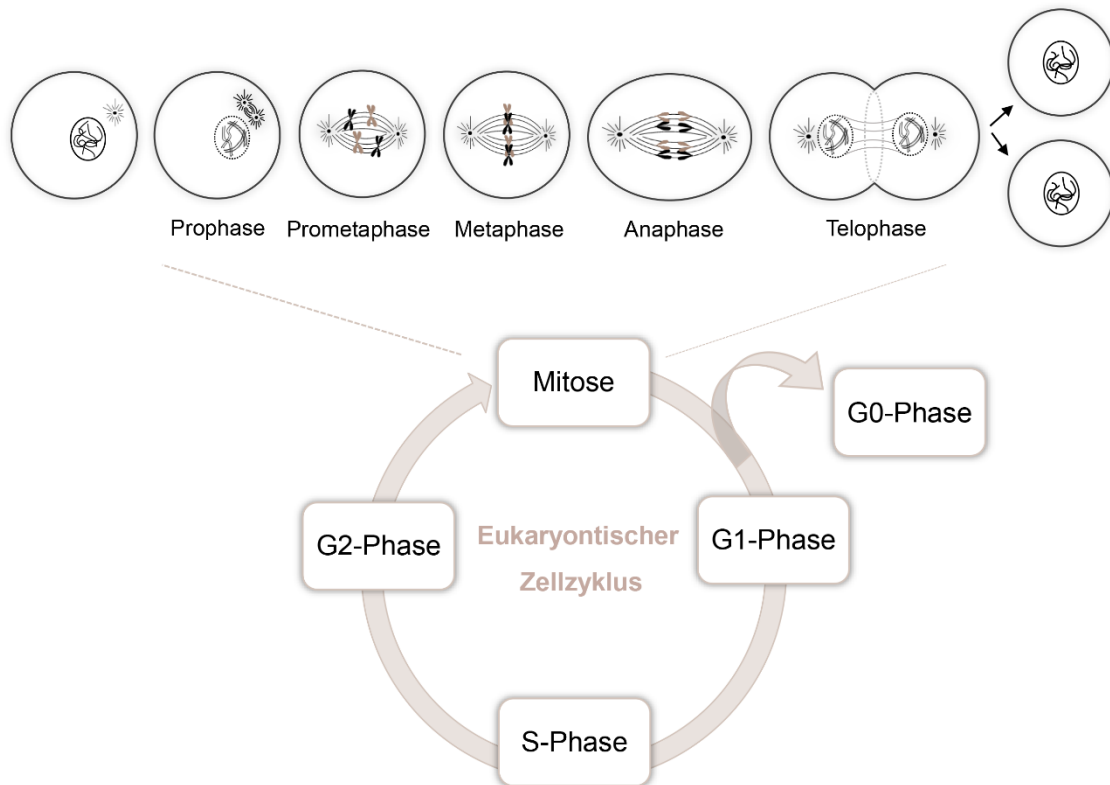


Abbildung 1 | Zellzyklus einer eukaryontischen Zelle. Die zentralen Ereignisse im Verlauf eines Zellzyklus repräsentieren die identische Replikation des genetischen Materials in S-Phase und dessen gleichmäßige Verteilung auf beide neu entstehenden Tochterzellen in M-Phase. Im Vorfeld dieser Prozesse durchläuft die Zelle jeweils eine von zwei *Gap*-Phasen, G1- bzw. G2-Phase. Diese Phasen sind durch extensives Zellwachstum sowie eine hohe metabolische Aktivität der Zelle gekennzeichnet. Als Antwort auf bestimmte Signale kann die Zelle ausgehend von G1 in die proliferationsinaktive G0-Phase (Quieszenz) eintreten. In der M-Phase erfolgt die Teilung des Zellkerns mit der Verteilung der Chromosomen sowie die Cytokinese (für weitere Details siehe Text).

Um den ordnungsgemäßen und zeitlich koordinierten Ablauf der einzelnen Prozesse zu gewährleisten, verfügt die Zelle über ein komplexes, regulatorisches Netzwerk – das Zellzyklus-Kontrollsystem. Zwei Gruppen von Proteinen spielen dabei eine zentrale Rolle: Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) (Morgan, 1997; Murray, 2004). Letztere können

durch Phosphorylierung von spezifischen, für verschiedene Prozesse des Zellzyklus notwendigen Proteinsubstraten deren enzymatische Aktivität oder deren Bindungsaffinität zu anderen Interaktionspartnern modulieren. Die Kinaseaktivität der Cdks selbst beruht auf der Assoziation mit spezifischen regulatorischen Proteinen, den Cyclinen, deren intrazelluläre Konzentration in den meisten Fällen Zellzyklus-abhängig oszilliert (Murray, 2004). Besondere Kontrollpunkte (*checkpoints*) stellen den zeitlich und funktionell korrekten Ablauf des Zellzyklus sicher, indem das Voranschreiten des Zellzyklus nur dann ermöglicht wird, wenn alle Vorgänge der vorhergehenden Phase vollständig und fehlerfrei abgelaufen sind (zur Übersicht siehe Morgan, 2007; Klug, 2012).

1.2 Prinzipien der Mitose

Um aus einer Zelle zwei genetisch identische Tochterzellen hervorzubringen, muss die gesamte Erbinformation in Form von Chromosomen äquivalent auf diese aufgeteilt werden. Die Segregation des genetischen Materials geschieht im Verlauf der Mitose, welche entsprechend bestimmter morphologischer Kriterien in weitere fünf Phasen klassifiziert wird (Abb. 1). Die initiale Phase wird als Prophase bezeichnet. In ihr setzt die Chromosomenkondensation ein. Die langen, faserartigen Chromatinstränge werden zu kompakten, lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen, den Chromosomen kompaktiert. Auf diese Weise wird die zelluläre, genomische DNA in eine physiologisch inaktivere Transportform konvertiert. Gleichzeitig wird durch die Migration der Centrosomen zu den gegenüberliegenden Zellpolen die Assemblierung der mitotischen Spindel initiiert. In der sich anschließenden Prometaphase erfolgt in den meisten Metazoen die Auflösung der Kernhülle (*nuclear envelope breakdown*, NEBD). Dieser Schritt ist unerlässlich für die Anheftung der Chromosomen an die Mitosespindel. Die von den Centrosomen ausgehenden Mikrotubuli assoziieren mit speziellen, an den Centromeren der Chromosomen befindlichen Proteinstrukturen, den Kinetochoren (Musacchio and Desai, 2017). Von nun an können die Chromosomen durch die Dynamik der Mitosespindel bewegt und transportiert werden bis diese schließlich zentral in der Äquatorialebene der Mitosespindel angeordnet sind. Diese charakteristische Anordnung der Chromosomen wird als Metaphaseplatte bezeichnet und gilt als hauptsächliches Merkmal der Metaphase. Bis zu diesem Zeitpunkt werden die beiden identischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms durch den ringförmigen

Proteinkomplex Cohesin physikalisch verknüpft (Haering et al., 2008; Losada et al., 1998; Michaelis et al., 1997). Die so vermittelte Schwesterchromatidkohäsion verhindert eine frühzeitige Separation der Schwesterchromatiden und garantiert deren korrekte bipolare Anheftung an die Spindelmikrotubuli. Die proteolytische Spaltung der Cohesin-Ringkomplexe führt unmittelbar zur Trennung der Schwesterchromatiden und kennzeichnet den Beginn der Anaphase (Uhlmann et al., 1999; Uhlmann et al., 2000). In Folge einer Depolymerisation und Verkürzung der Spindelmikrotubuli werden die getrennten Chromatiden zu den entgegengesetzten Spindelpolen gezogen. In Telophase schließlich lässt sich erstmals die durch cytoskelettale Proteine vermittelte Einschnürung der Zelle im Bereich der Spindelmitte beobachten. Gleichzeitig kommt es zur Dekondensation der Chromosomen, Disassemblierung der Spindel sowie zur Neuassemblierung der Kernhülle. Nach Beendigung der Mitose erfolgt die eigentliche Teilung der Zelle (Cytokinese). Die Zelle elongiert und ein kontraktiler Ring aus Myosin und Aktinfilamenten sowie zahlreiche weitere Komponenten vermitteln die Teilung und Abschnürung der beiden Tochterzellen (zur Übersicht siehe McIntosh et al., 2012).

1.3 Prinzipien der Meiose

Die Meiose stellt eine spezielle Art der Zellteilung im Verlauf der Keimzellbildung dar. Sie bildet die fundamentale Voraussetzung für die sexuelle Reproduktion. Diese gilt als eines der Grundprinzipien der Evolution und ermöglicht durch die Steigerung der genetischen Vielfalt die Entstehung komplexer Lebensformen. Die sexuelle Fortpflanzung basiert auf der Fusion einer männlichen und einer weiblichen Keimzelle zur Zygote. Um den Ploidiegrad eines Organismus konstant zu halten und einer Verdopplung des Chromosomengehalts in jeder Folgegeneration entgegenzuwirken, muss bei der Entstehung der Keimzellen eine Reduktion der Chromosomenzahl stattfinden. Die Halbierung des Chromosomenbestandes erfolgt während der Meiose, wobei ausgehend von einer diploiden Vorläuferzelle ein oder mehrere haploide Gameten erzeugt werden. Zu diesem Zweck erfolgen zwei aufeinanderfolgende Zellteilungen (Meiose I und Meiose II) ohne dazwischenliegende DNA-Replikation. Ein besonderes Kennzeichen der Meiose ist, dass nicht nur die beiden Schwesterchromatiden, sondern auch beide homologen Chromosomen voneinander getrennt werden müssen. Während im

Verlauf der ersten meiotischen Teilung (Reduktionsteilung) die beiden Homologen segregiert werden, erfolgt in der zweiten meiotischen Teilung (Äquationsteilung) die Segregation der Schwesterchromatiden (Page and Hawley, 2003; Petronczki et al., 2003). Obwohl beide meiotische Teilungen grundsätzlich auf denselben mechanistischen Prinzipien beruhen wie die Mitose, weist die erste meiotische Teilung dennoch einige konzeptionelle Besonderheiten auf. Anders als in Mitose müssen neben den Schwesterchromatiden auch die homologen Chromosomen physikalisch verbunden werden, um deren korrekte Verteilung in Meiose I zu gewährleisten. Die Paarung der homologen Chromosomen erfolgt zumeist in der ersten meiotischen Prophase im Rahmen der meiotischen Rekombination (Szekvolgyi and Nicolas, 2010). Mit Beginn der ersten meiotischen Prophase wird die Konjugation der Homologen initiiert. Die Achsen der homologen Chromosomen werden parallel und in großer räumlicher Nähe zueinander ausgerichtet (Synapsis) (McKee, 2004). Bislang ist die exakte molekulare Grundlage dieser frühen Homologenpaarung nicht eindeutig geklärt. Ausgehend von definierten chromosomalen *Loci* wird der Synaptonemale Komplex (SC) assembliert, eine komplexe, proteinreiche Struktur, welche die beiden Homologen schließlich über ihre gesamte Länge zusammenhält (Page and Hawley, 2004). Die über den SC verbundenen, homologen Chromosomen werden als Bivalente oder Tetraden bezeichnet. Durch die enzymatisch katalysierte Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen wird der Prozess der meiotischen Rekombination eingeleitet (Keeney et al., 1997; Szekvolgyi and Nicolas, 2010). Die Reparatur derartiger Doppelstrangbrüche erfolgt durch Rekombinationsereignisse mit den komplementären DNA-Sequenzen des jeweiligen homologen Chromosoms. Dabei können als Rekombinationsintermediate sogenannte *Crossing-over* entstehen, welche lichtmikroskopisch als Chiasmata innerhalb eines Bivalents erkennbar sind (Szekvolgyi and Nicolas, 2010; Zickler and Kleckner, 2015). Die meiotische Rekombination ermöglicht so den reziproken Austausch von DNA-Abschnitten zwischen beiden homologen Chromosomen und trägt folglich zur Entstehung neuer Gen- bzw. Allelkombinationen und zur genetischen Variabilität innerhalb einer Population bei. Nach Disassemblierung des SC bleiben die Homologen bis zu ihrer Trennung in Anaphase I lediglich an den Stellen der *Crossing-over* durch Cohesin-Ringe distal der Rekombinationsstellen verbunden (Carpenter, 1994; Petronczki et al., 2003). Die Schwesterchromatiden eines Chromosoms bleiben ebenfalls durch Cohesin proximal der Rekombinationsstellen verknüpft. Aufgrund der konzeptionellen Unterschiede zur Mitose, muss die Freisetzung von

Cohesin in Meiose unterschiedlichen Anforderungen gerecht werden. Während die Kohäsion entlang der Chromosomenarme bereits in Anaphase I aufgelöst werden muss, um die Separation der Homologen zu ermöglichen, muss die Kohäsion in der Centromerregion bis zum Eintritt in Anaphase II kontinuierlich erhalten bleiben (Nasmyth and Haering, 2009; Petronczki et al., 2003; Watanabe, 2004). Ein weiteres charakteristisches Merkmal der Meiose ist die als Monoorientierung bezeichnete Anheftung der Schwesterchromatiden eines Chromosoms an die Meiosespindel in Meiose I (Moore and Orr-Weaver, 1998; Watanabe, 2006, 2012). Da im Verlauf der ersten meiotischen Teilung beide Schwesterchromatiden simultan zu einem der beiden Zellpole transportiert werden, dürfen deren Kinetochore nur mit den Mikrotubuli eines Spindelpols assoziiert werden. Vermutlich basiert die Monoorientierung auf einer physikalischen Verknüpfung der beiden Schwesterkinetochore (Goldstein, 1981). Erste Hinweise auf potentielle Mechanismen liefert die Identifikation des Kinetochor-assoziierten Monopolin-Komplexes in *S. cerevisiae* (Corbett et al., 2010; Toth et al., 2000) sowie der Meiose-spezifischen Kinetochorkomponente Meikin in Maus-Oocyten (Kim et al., 2015), welche zwar in Meiose I nicht jedoch in Meiose II oder Mitose funktionell zu sein scheint.

1.3.1 Meiose in *Drosophila melanogaster*

In der weiblichen Meiose von *D. melanogaster* unterliegen Paarung und Segregation der Chromosomen den konventionellen Mechanismen von Rekombination, SC Formation und Ausbildung von Chiasmata (Lake and Hawley, 2012; Orr-Weaver, 1995). Daneben existiert ein zweiter, rekombinationsunabhängiger Mechanismus für die Homologenpaarung. Trotz der Inhibition von *Crossing-over* und Genkonversion kann ein voll funktioneller SC zwischen den homologen Chromosomen assembliert werden (McKim et al., 1998). Die rekombinationsunabhängige Segregation tritt überwiegend im Fall des IV. Chromosoms, seltener im Fall des X-Chromosoms auf. Die beiden homologen IV. Chromosomen, welche im Vergleich zu den anderen Chromosomen maßgeblich kleiner sind und nur etwa 3,5 % des gesamten Fliegen-genoms ausmachen (Sun et al., 2000), können korrekt und ordnungsgemäß segregiert werden, obwohl nachweislich keine Chiasmata zwischen diesen ausgebildet werden. Dieses Phänomen, welches als achiasmatische Segregation bezeichnet wird, stellt in *D. melanogaster* somit einen Sekundärmechanismus der Homologensegregation in Meiose I

dar (Hawley and Theurkauf, 1993). Die Segregation achiasmatischer Chromosomen beruht auf mehreren unterschiedlichen mechanistischen Prinzipien, unter anderem auf der Paarung der Chromosomen über deren Homologie in heterochromatischen DNA Regionen (Dernburg et al., 1996; Hawley et al., 1992; Karpen et al., 1996). Die männliche Meiose in *D. melanogaster* hingegen unterscheidet sich wesentlich von den Gesetzmäßigkeiten der klassischen Meiose.

1.3.2 Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Da die männliche Meiose im Kontext der Keimzellbildung abläuft, und viele morphologische Besonderheiten der männlichen Keimdrüse von Relevanz für die vorliegende Arbeit sind, wird zunächst die Spermatogenese von *Drosophila* näher beleuchtet. Die Spermatogenese von *D. melanogaster* erfolgt in den paarweise im hinteren Bereich des Abdomens befindlichen Hoden. Adulte Männchen besitzen schlauchförmige, schneckenartig gewundene Hoden, die mit dem Samenausführgang und Anhangsdrüsen verbunden sind. In den larvalen sowie frühen pupalen Stadien erscheinen die Hoden linsenförmig und liegen bisweilen ohne Verbindung zu anderen Organen vor. Erst in der späten Puppenphase wird der Kontakt zu den weiteren Organen des männlichen Genitaltrakts etabliert (Bodenstein, 1950). Die Entwicklung der Keimzellen beginnt stets in der apikalen Spitze des Hodens. Diese enthält ein Cluster aus etwa 20 somatischen, nicht-proliferativen Apikalzellen, den sogenannten *Hub* Zellen. Adhärent mit diesen sind zwei weitere Zelltypen: die gonialen Stammzellen und die Zystenvorläuferzellen (Abb. 2). Zusammen bilden diese eine Stammzellnische (Hardy et al., 1979). Die somatischen Apikalzellen verkörpern eine wichtige Signalzentrale und erfüllen vorwiegend regulatorische Funktionen in Bezug auf die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen. Mit Beginn der Spermatogenese durchläuft jede Keimbahnstammzelle und Zystenvorläuferzelle unter homeostatischen Bedingungen eine räumlich orientierte, asymmetrische Teilung (Abb. 2). Dabei entsteht aus jeder Zystenvorläuferzelle eine neue Zystenvorläuferzelle sowie eine somatische Zystzelle. Aus einer Keimbahnstammzelle entstehen durch die asymmetrische Teilung je eine weitere Stammzelle und ein sogenannter Gonioblast (Yamashita et al., 2003). Diejenige Tochterzelle, die sich dabei lateral vom Keimzentrum entfernt, differenziert zum Gonioblasten, während die Tochterzelle, welche die Adhärenz zu den zentralen Apikalzellen aufrechterhält,

Stammzellcharakter behält. Der Gonioblast diffundiert aus der Stammzellnische und wird unmittelbar von zwei somatischen Zystzellen umgeben. Im Innern jeder Zyste finden schließlich alle weiteren Prozesse der Spermatogenese bis hin zur Bildung reifer Spermien statt. Der Gonioblast durchläuft im Folgenden eine Amplifikationsphase aus vier unvollständigen Mitosen, an deren Ende 16 Spermatogonien vorliegen, die über Plasmabrücken, sogenannte Ringkanäle, verbunden bleiben und alle nachfolgenden Entwicklungsschritte synchron durchlaufen (Abb. 2).

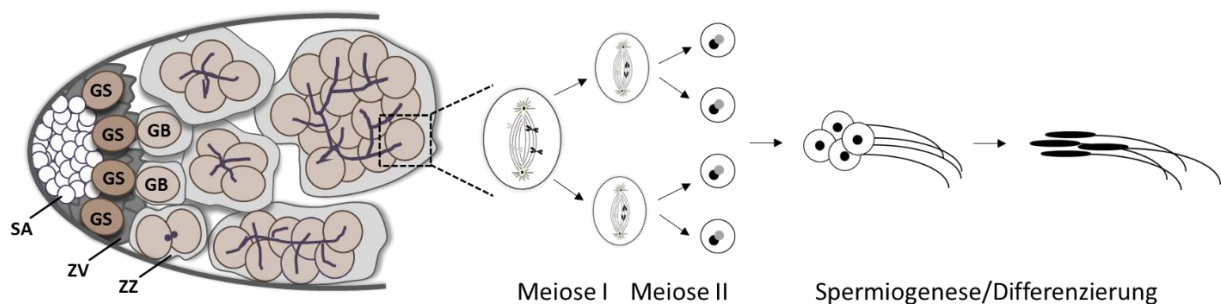


Abbildung 2 | Übersicht über die männliche Keimzellbildung in *D. melanogaster*. In der apikalen Spitze jedes Hodens befindet sich eine Stammzellnische, welche drei hauptsächliche Zelltypen enthält: Somatische Apikalzellen (SA), goniale Stammzellen (GS) und Zystenvorläuferzellen (ZV). Durch eine asymmetrische Teilung entsteht aus jeder gonialen Stammzelle eine neue Stammzelle und ein Gonioblast (GB), welcher unmittelbar von zwei somatischen Zystzellen (ZZ) ummantelt wird. Der Gonioblast durchläuft im Anschluss eine Amplifikationsphase aus vier Mitosen mit unvollständiger Cytokinese, an deren Ende 16 Spermatogonien vorliegen, die über Plasmabrücken verbunden bleiben. Nach einer ausgeprägten Wachstumsphase treten die primären Spermatozyten in die Meiose ein. Durch zwei aufeinanderfolgende meiotische Teilungen entsteht schließlich ein Bündel aus 64 haploiden Spermatiden. In einer Phase extensiver Differenzierung verändert sich die Morphologie der Spermatidenkerne, Flagellen werden ausgebildet und die reifen Spermien schließlich vereinzelt.

In der frühen Phase des 16-Zell-Stadiums erfolgt die prämeiotische S-Phase, an deren Ende die Keimbahnzellen im Inneren der syncytialen Zyste als primäre Spermatozyten bezeichnet werden. In der sich anschließenden G2-Phase und ersten meiotischen Prophase findet ein Großteil der Entwicklung der primären Spermatozyten statt. Während dieser Phase, welche einen Zeitraum von bis zu 90 Stunden beanspruchen kann, wachsen die Spermatozyten auf das 25-fache ihres Volumens an (Lindsley and Tokayasu, 1980) und transkribieren eine Vielzahl von Genen, um essentielle Faktoren für die anschließende Meiose sowie

postmeiotische Differenzierungsprozesse zu akkumulieren (Olivieri and Olivieri, 1965). Aus jeder Gruppe von 16 reifen Spermatozyten entsteht durch die zwei meiotischen Teilungen ein Bündel aus 64 haploiden Spermatiden, welche im Rahmen der postmeiotischen Spermiogenese extensiven Differenzierungsprozessen unterzogen werden (zur Übersicht über die Spermatogenese siehe Fuller, 1993). Neben der Ausbildung der Spermienflagellen kommt es hierbei zu einer tiefgreifenden Reorganisation des Chromatins (Abb. 2). Durch den Austausch von somatischen Histonproteinen gegen Testes-spezifische Protaminvarianten wird ein enormer Kompaktierungsgrad des Spermienchromatins erreicht, welcher mit einer markanten Umgestaltung der Kernform einhergeht. Durch sukzessive Elongation nehmen die zunächst sphärischen Spermienkerne eine für sie charakteristische, nadelförmige und somit hydrodynamisch günstige Morphologie an. Der finale Schritt der Spermiogenese umfasst die Individualisierung der reifen Spermien durch Auflösung der interzellulären Cytoplasmabrücken (zur Übersicht über die Spermiogenese siehe Fabian and Brill, 2012).

1.3.3 Besonderheiten der männlichen Meiose in *Drosophila melanogaster*

Ein wesentliches Merkmal, welches die männliche Meiose in *D. melanogaster* von den konventionellen Mechanismen der Meiose anderer Eukaryonten unterscheidet, ist das Ausbleiben der meiotischen Rekombination und das Fehlen eines Synaptonemalen Komplexes (McKee et al., 2012). Um dennoch eine für die ordnungsgemäße Segregation erforderliche Homologenpaarung zu gewährleisten, müssen andersartige Mechanismen existieren, welche das Fehlen von Chiasmata und SC kompensieren. Im Verlauf der ersten meiotischen Prophase kommt es zu drastischen Umstrukturierungen des Chromatins. Obgleich das Chromatin zu diesem Zeitpunkt noch in dekondensiertem Zustand vorliegt, wird es in Form drei separater Chromatinmassen, sogenannten Chromatinterritorien, assembliert, welche der inneren Kernmembran anlagern (Cooper, 1965; Cenci et al., 1994). Jedes der drei Chromatinterritorien korrespondiert mit einem der großen Bivalente aus den beiden II., III. und Geschlechtschromosomen. Das Bivalent der wesentlich kleineren IV. Chromosomen kann entweder als einzelne Chromatinmasse in der Mitte des Zellkerns zu finden sein oder liegt assoziiert mit einem der anderen Territorien, gewöhnlich mit dem der Sexchromosomen, vor (Cenci et al., 1994; Tsai et al., 2011). Durch die Sequestrierung der einzelnen Bivalente in sub-nukleäre Kompartimente wird vermutlich deren stabile Adhäsion

und Paarung begünstigt (Cenci et al., 1994). Eine molekulare Grundlage für die achiasmatische Paarung ist die Interaktion der Homologen über spezifische chromosomale Bereiche, sogenannte Paarungsregionen. Da die heteromorphen Geschlechtschromosomen, anders als die Autosomen, mit Ausnahme der NOR (*nucleolus organizing region*) über keine homologen Sequenzabschnitte verfügen, müssen Paarung und Separation des X-Y-Bivalents über andere Mechanismen reguliert werden. Im Fall der Sexchromosomen fungieren 240 bp lange, repetitive Sequenzen im Bereich der heterochromatischen ribosomalen RNA-Gene als Paarungsregionen (Cooper, 1964; McKee et al., 1992; McKee and Karpen, 1990), während die für die Autosomenpaarung verantwortlichen Bereiche genomweit innerhalb des Euchromatins verteilt liegen (McKee et al., 1993; Yamamoto, 1979). Darüber hinaus konnten bereits mehrere *in trans* agierende Faktoren identifiziert werden, welche SC-unabhängig eine stabile Adhäsion der homologen Chromosomen vermitteln. Zwei grundlegende Faktoren sind die Proteine MNM (*Modifier of Mdg4 in Meiosis*) und SNM (*Stromalin in Meiosis*) (Thomas et al., 2005), deren Inaktivierung eine erhöhte Rate an chromosomaler *Nondisjunction* in Meiose I nach sich zieht. SNM und MNM sind chromosomale Proteine, welche im Verlauf von Meiose I mit allen vier Homologenpaaren kolokalisieren und mit beginnender Segregation der Homologen in Anaphase I wieder dissoziieren. Das auffälligste Lokalisationsmuster beider Proteine lassen die Geschlechtschromosomen erkennen. In diesem Fall kann eine Anreicherung im Bereich der für die Paarung relevanten repetitiven rDNA Sequenzen beobachtet werden. Die chromosomale Lokalisation von SNM und MNM beruht auf einer gegenseitigen Abhängigkeit und, im Fall von MNM, auf der Präsenz von *teflon* (Thomas et al., 2005). *teflon* kodiert für ein Nukleinsäure-bindendes Zinkfingerprotein. Die Mutation dieses Gens bewirkt eine vorzeitige Separation und Fehlsegregation der autosomalen Bivalente, nicht jedoch des X-Y-Bivalents (Tomkiel et al., 2001). Bezüglich der molekularen Wirkungsweise von SNM, MNM und Teflon existieren bislang keine verlässlichen Daten. Gemäß der aktuellen Vorstellung könnten diese kollektiv als Homologen-Konjugations-Komplex fungieren, der, ähnlich der Wirkungsweise des SC, die Homologen eines Bivalents physikalisch verknüpft und deren akkurate Segregation ermöglicht (McKee et al., 2012).

1.4 Chromosomenkondensation

Im Verlauf eines Zellzyklus wird das Chromatin einer Reihe von erheblichen strukturellen Umordnungen unterzogen. Diese dynamischen Veränderungen der Chromatinorganisation sind unerlässlich, um für die Zelle lebensnotwendige Prozesse zu ermöglichen: die vollständige Duplikation des genetischen Materials während der DNA-Replikation, die Expression von Genen sowie die Reparatur von DNA-Schäden. Die massivsten konformationellen Änderungen erfährt das Chromatin beim Eintritt in die Mitose. Zu diesem Zeitpunkt wird das gesamte Genom einer Zelle um das 200- bis 20000-fache komprimiert und zu robusten, stäbchenartigen Strukturen, den lichtmikroskopisch sichtbaren Chromosomen, kompaktiert (Li et al., 1998) (Abb. 3). Dieser als Chromosomenkondensation bezeichnete Prozess erfüllt zugleich mehrere Zwecke. Die enorme Verdichtung des Chromatins führt zu einer räumlichen Kompaktierung des genetischen Materials und bildet die Grundlage dafür, dass dessen Segregation innerhalb der Dimension einer einzelnen Zelle bewältigt werden kann. Darüber hinaus werden durch die strukturelle Umorganisation des Chromatins die physikalischen Eigenschaften der Chromosomen modifiziert. Chromosomen müssen sowohl starr und robust als auch elastisch genug sein, um widerstandsfähig gegenüber den von den Mikrotubuli der Mitosespindel ausgehenden Zugkräften zu sein, um DNA-Schäden zu verhindern (Gerlich et al., 2006). Schließlich führt die chromosomale Kondensation zusammen mit der Topoisomerase II-vermittelten DNA-Dekatenierung zur Individualisierung der Schwester-chromatiden (*sister chromatid resolution*) und Entfernung topologischer Verflechtungen zwischen einzelnen DNA-Strängen, die im Verlauf der DNA-Replikation entstehen (Holm, 1994). Obwohl die Restrukturierung des Chromatins beim Eintritt in die Mitose cytologisch äußerst markant ist und bereits Ende des 19. Jahrhunderts erstmals beschrieben wurde (Flemming, 1882), sind bis heute weder die exakte strukturelle Architektur der Chromosomen noch die der Chromosomenkondensation zugrundeliegenden molekularen Mechanismen eindeutig aufgeklärt. Trotz extensiver Bemühungen den Aufbau mitotischer Chromosomen zu charakterisieren existieren bis heute basierend auf mikroskopischen, biochemischen und genetischen Daten, unterschiedliche, teils kontroverse, Modelle bezüglich der Assemblierung von Chromosomen. Als am wahrscheinlichsten gelten das „*Hierarchical folding*“-Modell und das „*Scaffold*“-Modell (Abb. 3). Die grundlegende Struktureinheit bildet in beiden Fällen das Nukleosom. Dabei werden 146 bp doppelsträngiger DNA über exakt 1,7 Windungen um ein Oktamer aus

Histonproteinen gewunden (Davey et al., 2002; Kornberg, 1974; Luger et al., 1997). Ein Histonoktamer besteht jeweils aus zwei Kopien der Proteine H2A, H2B, H3 und H4 (Eickbush and Moudrianakis, 1978). Zwei benachbarte Nukleosomen werden durch eine ca. 50 bp lange Linker-DNA verbunden. Die lineare Anordnung der Nukleosomen verleiht der DNA-Faser einen Durchmesser von etwa 11 nm und ein perlenkettenartiges Aussehen (Abb. 3) (Olins and Olins, 1974). Als nächsthöhere Organisationsebene des Chromatins wird eine 30 nm-DNA-Faser diskutiert, die durch weiteres Aufwickeln der 11 nm-Faser entsteht (Abb. 3).

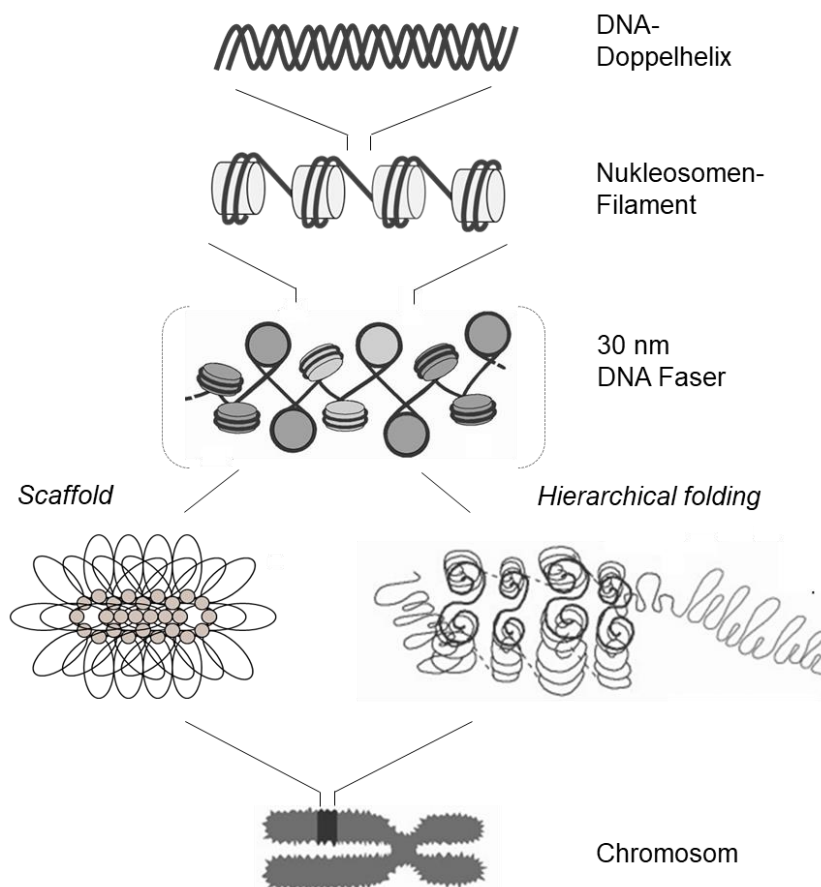


Abbildung 3 | Schematische Darstellung der Chromosomenkondensation. Die doppelhelikale DNA wird in zwei linksgerichteten superhelikalen Windungen um ein Oktamer aus Histonproteinen gewunden. Durch Assoziation des Linker-Histons H1 kommt es zur weiteren Faltung des Nukleosomenfilaments zu einer 30 nm-DNA-Faser. Für die weitere Strukturierung des Chromatins ausgehend von der 30 nm-DNA-Faser bis zu den mikroskopisch sichtbaren Metaphasechromosomen existieren unterschiedliche Modellvorstellungen: Das „Scaffold“-Modell und das „Hierarchical folding“ Modell (für weitere Details siehe Text).

Dies wird mutmaßlich einerseits durch die Interaktion einzelner Nukleosomen untereinander und andererseits durch die Assoziation des Histons H1 mit der Linker-Region zwischen benachbarten Nukleosomen vermittelt (Li and Reinberg, 2011; Robinson and Rhodes, 2006). Die Existenz der 30 nm-DNA-Faser *in vivo* ist jedoch fraglich und wird stark debattiert. Neuere Cryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen von HeLa-Zellkernen sowie isolierten hydratisierten, mitotischen Chromosomen lieferten keine Beweise für die Existenz einer derartigen Struktur (Joti et al., 2012; Maeshima et al., 2010; Razin and Gavrilov, 2014). Das „*Hierarchical folding*“-Modell postuliert, dass die DNA über mehrere aufeinanderfolgende Organisationsebenen stufenweise durch helikales Aufwickeln zu konsekutiv höher geordneten Strukturen bis hin zu den sichtbaren Chromosomen verpackt wird (Belmont et al., 1987; Sedat and Manuelidis, 1978). Das „*Scaffold*“-Modell hingegen suggeriert, basierend auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen, eine Assemblierung des mitotischen Chromatins in Form von Schleifen von jeweils mehreren 10 kb, welche radial an einem zentralen, proteinreichen Gerüst entlang der Chromosomenachse angeheftet sind (Marsden and Laemmli, 1979; Paulson and Laemmli, 1977). Die höher geordnete, zylindrische Struktur metaphasischer Chromosomen kann nicht allein durch Chromatin-Chromatin-Assoziation generiert werden, sondern bedarf der synergistischen Aktivität multipler Faktoren. Kürzlich gelang es ein Minimum an erforderlichen Faktoren zu identifizieren, um mitotische Chromosomen *in vitro* zu rekonstruieren. Als für die Chromosomenkondensation erforderliche Schlüsselkomponenten wurden dabei neben den drei Histon Chaperonen Nucleoplasmin, Nap1 (*nucleosome assembly protein 1*) und FACT (*facilitates chromatin transcription*), Topoisomerase II sowie der Proteinkomplex Condensin identifiziert (Shintomi et al., 2015).

1.5 Condensin

Condensine sind hochkonservierte, multimere Proteinkomplexe, die für viele Prozesse des Chromosomenmetabolismus essentielle Funktionen erfüllen. Condensin oder Condensin-ähnliche Komplexe konnten in allen bislang sequenzierten eukaryontischen Genomen sowie in den Genomen fast aller prokaryontischer Spezies nachgewiesen werden (Graumann and Knust, 2009; Hirano, 2012). Archaeen und Bakterien (wobei *Bacillus subtilis* in diesem Zusammenhang am besten untersucht ist) verfügen über einen heterotrimeren Komplex

bestehend aus den Untereinheiten SMC, ScpA und ScpB, während γ -Proteobakterien, einschließlich *E. coli*, den entfernt verwandten Komplex MukBEF besitzen (Graumann and Knust, 2009; Rybenkov et al., 2014). Die meisten Metazoen-Genome hingegen kodieren für zwei unterschiedliche Condensin-Komplexe, Condensin I und Condensin II, welche eine hohe strukturelle sowie funktionelle Ähnlichkeit aufweisen. Die erstmalige Beschreibung von Condensin erfolgte im Rahmen von Chromosomen-Rekonstitutionsexperimenten in zellfreien Eiextrakten aus *Xenopus laevis*. Dabei wurde eine für den Proteinkomplex essentielle Funktion bei der Chromosomenkondensation und der Aufrechterhaltung der Struktur kondensierter Chromosomen *in vitro* nachgewiesen und der Name „Condensin“ geprägt (Hirano et al., 1997; Hirano and Mitchison, 1994). Unabhängig davon wurde in Hühnerzellen das *Scaffold* Protein II, ScII, als Komponente des Chromosomengerüsts charakterisiert, welches später als die Condensin-Untereinheit SMC2 identifiziert wurde (Saitoh et al., 1994). Einige Jahre später gelang es zeitgleich sowohl in HeLa-Zellen als auch *Xenopus*-Eiextrakten die Existenz eines zweiten, weniger abundanten Condensin-Komplexes (Condensin II) zu belegen (Ono et al., 2003; Yeong et al., 2003). Dieser besitzt zum einen zwei identische Untereinheiten wie Condensin I, während die restlichen Untereinheiten eine hohe Homologie zu den kanonischen Condensin-Untereinheiten aufweisen.

1.5.1 Aufbau und Struktur von Condensin-Komplexen

Eukaryontische Condensine sind heteropentamere Proteinkomplexe mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 650 kDa (Hirano et al., 1997). Das Grundgerüst bilden die beiden *Structural Maintenance of Chromosomes* (SMC)-Proteine, SMC2 und SMC4, aus der Familie der *ATP-binding cassette* (ABC) ATPasen (Abb. 4). SMC-Proteine besitzen eine charakteristische Topologie und Domänenstruktur mit speziellen molekularen Eigenschaften. An ihrem C- sowie N-terminalen Ende befinden sich zwei globuläre Nukleotidbindedomänen, die entsprechend ihrer Konsensussequenz als *Walker A* und *Walker B* Motive einzuordnen sind. Während die N-terminale Domäne ein NTP-Bindemotiv (*Walker A* Motiv) trägt, besitzt der C-Terminus eine DA-Box mit potentieller ATP-Hydrolyse-Aktivität (*Walker B*) (Akhmedov et al., 1998; Strunnikov and Jessberger, 1999; Walker et al., 1982). Die beiden Nukleotidbindedomänen sind über zwei lange, flexible, α -helikale Domänen (300-400 Aminosäuren) miteinander verbunden, welche ihrerseits durch eine

etwa 150 Aminosäuren große Domäne getrennt sind, die als *hinge*-Region bezeichnet wird (Jessberger et al., 1998; Strunnikov and Jessberger, 1999). Ein besonderes Charakteristikum der SMC-Proteine ist die Eigenschaft der beiden α -helikalen Segmente über intramolekulare Wechselwirkungen antiparallel auf sich selbst zurück zu falten und so eine stäbchenartig aussehende *coiled coil* Struktur auszubilden. Dabei kommt es durch die Assoziation von N- und C-Terminus zur Entstehung einer funktionellen ATPase an einem Ende sowie einer Scharnierregion am anderen Ende des gefalteten Proteins (Anderson et al., 2002; Melby et al., 1998). Die beiden SMC-Proteine (SMC2 und SMC4) dimerisieren durch Interaktion ihrer Scharnierregionen unter Bildung eines V-förmigen Komplexes (Anderson et al., 2002).

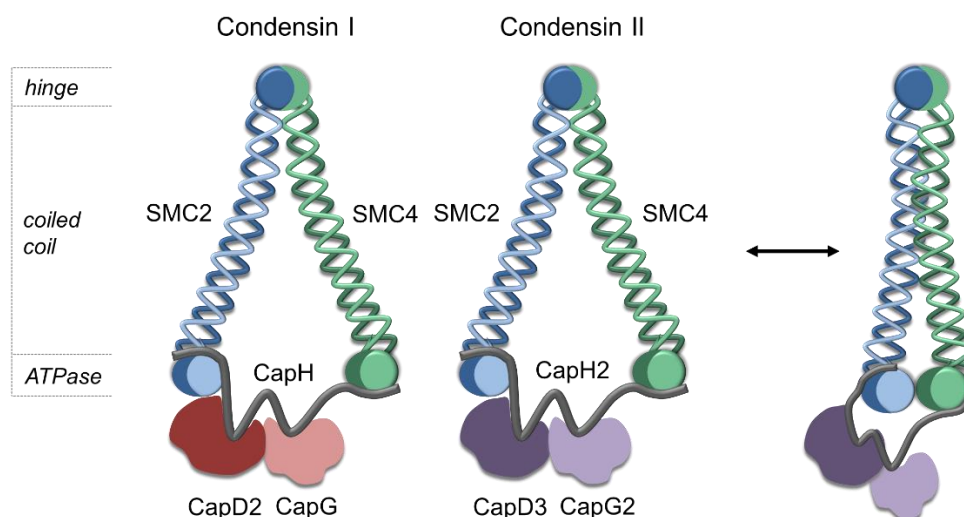


Abbildung 4 | Aufbau und Architektur eukaryontischer Condensin-Komplexe. Die meisten Metazoen kodieren für zwei paraloge, heteropentamere Condensin-Komplexe, Condensin I und Condensin II. Beiden Komplexen sind die *Structural Maintenance of Chromosomes*-Untereinheiten, SMC2 und SMC4, gemein. SMC-Proteine besitzen eine charakteristische Proteinstruktur bestehend aus einer globulären *hinge* Domäne an einem Ende, einer zentralen, flexiblen *coiled coil* Region, sowie einer globulären Kopfdomäne (*head*) mit ATPase Aktivität am anderen Ende des gefalteten Proteins. Beide SMC-Proteine dimerisieren durch Interaktion ihrer *hinge* Domänen und werden durch Assoziation der Kopfdomänen mit einer weiteren Untereinheit (CapH/Barren bzw. CapH2) aus der Familie der Kleisine miteinander verbrückt, wodurch eine dreigliedrige, ringförmige Struktur entsteht. Über die Kleisin-Untereinheit werden jeweils zwei weitere akzessorische Proteine (CapG und CapD2 bzw. CapG2 und CapD3) an den Komplex rekrutiert. Condensine sind dynamische Proteinkomplexe und treten in mehreren physiologischen Konformationen auf, welche sich ineinander umwandeln können. Neben einer offenen, V-förmigen Konformation (links) gibt es Beobachtungen von Condensin in einer geschlossenen, stäbchenförmigen Konformation (rechts), bei der die *coiled coil* Segmente der beiden SMC-Proteine durch intermolekulare Wechselwirkungen miteinander assoziiert sind. Die Konformationsänderung ist hier repräsentativ für Condensin II gezeigt.

Neuere auf Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie basierende Daten von SMC-Dimeren sowie Condensin-Holokomplexen aus Vertebraten- und Hefezellen lieferten wichtige Indizien über die exakte Geometrie dieser Komplexe. Demnach sind SMC-Dimere hoch flexible und dynamische Polymere, die unterschiedliche dreidimensionale Konformationen einnehmen können (Eeftens et al., 2016). Neben ihrer charakteristischen V-förmigen Struktur (*V-shape*) konnten Condensin-Komplexe gehäuft in einer „geschlossenen“ Konformation beobachtet werden (*I-shape*) (Abb. 4). In diesem Fall treten die beiden *coiled coil* Arme der beteiligten SMC-Proteine über ihre gesamte Länge in große räumliche Nähe zueinander, was dem Komplex ein stäbchenförmiges Aussehen mit einer Länge von 45 nm und einer Breite von näherungsweise 4,5 nm verleiht und als „rod“-Konformation bezeichnet wird (Anderson et al., 2002; Barysz et al., 2015). *Cross-linking*-Experimente und kristallographische Rekonstitutionen von bakteriellen SMC-Homodimeren bestätigen die enge Assoziation beider SMC-Proteine entlang deren *coiled coil* Regionen (Diebold-Durand et al., 2017). Die dynamische Konformation von Condensin verleiht dem Komplex mutmaßlich wichtige mechanochemische Eigenschaften für dessen physiologische Funktion bei der Chromatinorganisation. Die beiden ATPase Kopfdomänen des SMC-Dimers interagieren im Holokomplex mit einer weiteren Proteinuntereinheit, aus der Familie der Kleisine (Abb. 4). Kleisin-Proteine sind durch *winged helix* Domänen (WHD) an beiden Termini sowie eine zentrale ungeordnete Region gekennzeichnet (Schleiffer et al., 2003). Die Kleisin-Untereinheiten der Condensin-Komplexe (CapH/Barren in Condensin I bzw. CapH2 in Condensin II) assoziieren über ihren N-Terminus mit dem als „neck“ bezeichneten, proximal zur Kopfdomäne gelegenen *coiled coil* Bereich von SMC2 und mit ihrem C-Terminus mit der Kopfdomäne von SMC4 (Burmam et al., 2013; Onn et al., 2007). Schließlich verfügen beide Condensin-Komplexe über je zwei weitere akzessorische Untereinheiten, die durch Interaktion mit dem jeweiligen Kleisin an den Komplex binden (Abb. 4). CapG und CapD2 bzw. CapG2 und CapD3 sind durch das Vorhandensein von *Huntingtin*, *elongation factor 3*, *A-subunit of protein phosphatase 2A*, *TOR lipid kinase* (HEAT)-repeat Motiven gekennzeichnet, flexible Bereiche amphiphiler α -Helices, welche in erster Linie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Andrade and Bork, 1995; Neuwald and Hirano, 2000; Onn et al., 2007). Die peripheren HEAT-Untereinheiten besitzen zudem wesentliche DNA-bindende Eigenschaften und erfüllen eine signifikante Funktion bei der initialen Rekrutierung von Condensin an die DNA. Neuesten Erkenntnissen zu Folge wird die DNA zunächst in einer

von den Untereinheiten CapG und Barren geformten, positiv geladenen Furche gebunden und in dieser durch eine Peptid-Schleife der Kleisin-Untereinheit eingeschlossen. Dieser sogenannte „safety belt“-Mechanismus verhindert die sofortige Dissoziation der DNA und sorgt für eine stabile Condensin-DNA-Interaktion (Kschonsak et al., 2017; Piazza et al., 2014).

1.5.2 Subzelluläre Lokalisation und Dynamik der Condensin-Komplexe

Trotz ihrer hohen Konserviertheit besteht eine enorme Variabilität hinsichtlich der Lokalisation und Dynamik der Condensin-Komplexe unter den verschiedenen Spezies. Unizelluläre Organismen, wie die Pilze *S. cerevisiae* und *S. pombe*, besitzen einen einzelnen universellen Condensin-Komplex. Während dieser bei *S. pombe* im Verlauf der Interphase cytoplasmatisch lokalisiert und erst in Mitose am Chromatin akkumuliert, ist er im Fall von *S. cerevisiae* während des gesamten Zellzyklusverlaufs im Zellkern präsent (Freeman et al., 2000; Sutani et al., 1999). Auch in Vertebraten unterscheiden sich die beiden Condensin-Komplexe, Condensin I und Condensin II, deutlich in ihrer zeitlichen sowie räumlichen Verteilung innerhalb der Zelle (Abb. 5). Condensin II ist in Interphase nukleär angereichert und kann bereits in der frühen Prophase am Chromatin nachgewiesen werden. Demgegenüber sind Condensin I-spezifische Proteine zunächst im Cytoplasma sequestriert. Erst nach Zusammenbruch der Kernhülle in Prometaphase sind diese befähigt mit dem Chromatin zu assoziieren (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Lediglich eine geringe Fraktion von Condensin I scheint auch in interphasischen Zellen nukleär lokalisiert zu sein. Korrespondierende Daten aus humanen und Hühnerzellen suggerieren, dass Condensin I in G1-Phase im Kern persistiert und erst im Verlauf von S- und G2-Phase graduell verschwindet (Li et al., 2015; Schmiesing et al., 2000; Zhang et al., 2016). Im Zeitraum von Metaphase bis Telophase können beide Condensin-Komplexe gleichsam am Chromatin nachgewiesen werden und lokalisieren in einem charakteristischen, alternierenden Muster entlang der zentralen Achse kondensierter Chromosomen (Ono et al., 2004; Ono et al., 2003). Genomweite Analysen auf der Basis von herkömmlichen *microarray*- (*ChIP-chip*) oder *ChIP-seq*-Experimenten liefern detaillierte Erkenntnisse über die chromosomale Lokalisation und Distribution von Condensin. Zwar scheinen die Condensin-Bindestellen nicht mit spezifischen DNA-Sequenzmotiven zu korrelieren, jedoch gibt es bestimmte genomische *Loci*, an welchen sich Condensin präferentiell anzureichern scheint. Dazu gehören centromerische und

pericentromerische Bereiche, Telomerregionen sowie repetitive Regionen wie rDNA *Loci* (D'Ambrosio et al., 2008; Tanaka et al., 2012; Wang et al., 2005).

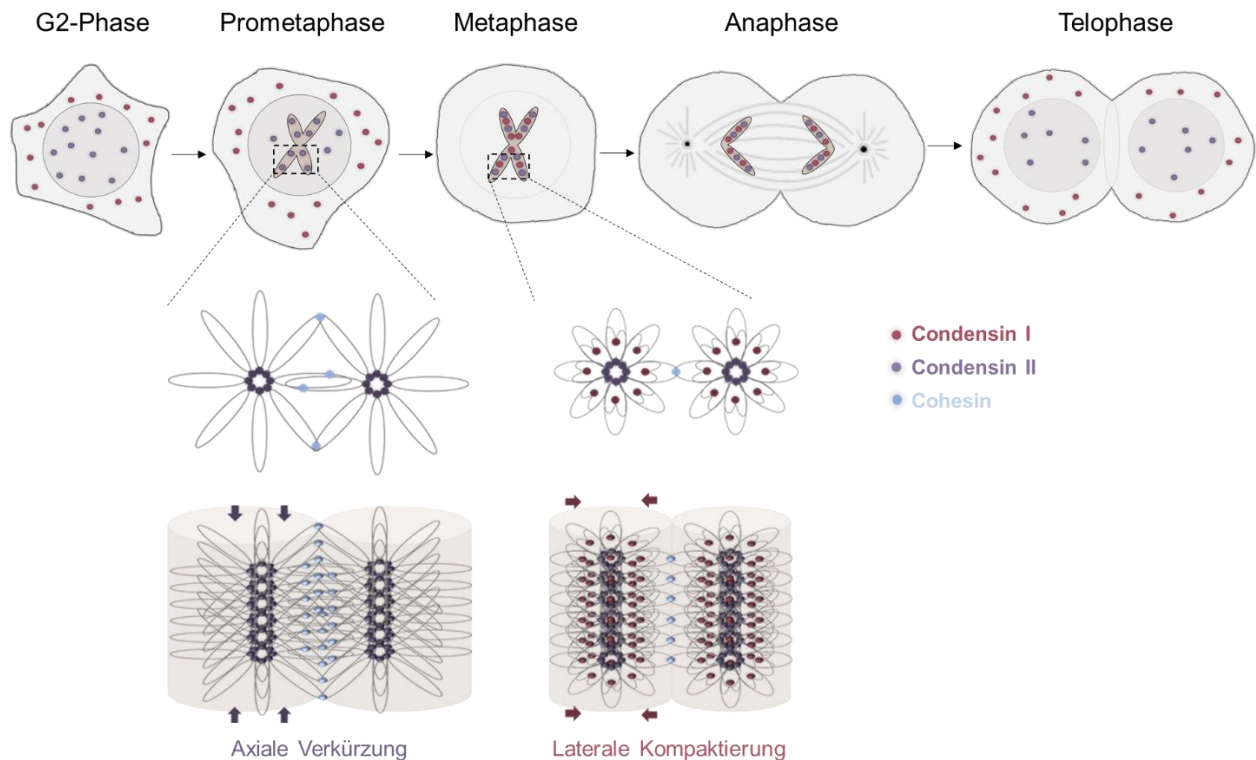


Abbildung 5 | Lokalisation und Dynamik der Condensin-Komplexe. Die Lokalisation der Condensin-Komplexe unterliegt Zellzyklus-abhängigen Veränderungen und variiert zwischen den beiden Komplexen. Condensin II (violett) bleibt über den gesamten Zellzyklus im Kern lokalisiert und trägt nach Bindung an die DNA in der frühen Prophase zur axialen Verkürzung der Chromosomenarme bei. Condensin I (rot) ist in Interphase größtenteils cytoplasmatisch angereicht und assoziiert erst nach Auflösung der Kernmembran mit dem Chromatin. Es vermittelt eine weitere laterale Kompaktierung der Chromosomenarme. Von Metaphase bis Telophase sind beide Condensin-Komplexe in einem charakteristischen Muster entlang der zentralen Achse der kondensierten Chromosomen nachweisbar. Das Zusammenspiel beider durch Condensin I und II vermittelter Beiträge zur Strukturierung des Chromatins ist notwendig um in Metaphase zwei vollständig aufgelöste Schwester-chromatiden zu erhalten. Diese werden bis zu deren Segregation in Anaphase durch den Proteinkomplex Cohesin (blau) physikalisch verknüpft. Modifiziert nach Hirano, 2012.

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Experimente deuten zudem auf differentielle Bindedynamiken und -kinetiken der beiden Condensin-Komplexe hin. Condensin II zeichnet sich durch eine sehr stabile Assoziation mit dem Chromatin aus, während die Chromatinassoziation von Condensin I hochdynamisch ist und während der Mitose einem kontinuierlichen *turnover* unterliegt (Gerlich et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

In Übereinstimmung mit den erheblichen Unterschieden in Lokalisationsverhalten und Dynamik konnte gezeigt werden, dass Condensin I und Condensin II zwar nicht-redundante, jedoch teilweise überlappende Funktionen bei der Assemblierung mitotischer Chromosomen erfüllen (Abb. 5). Während Condensin II bereits in die anfänglichen Schritte der Chromosomenkompaktierung eingreift und eine initiale axiale Verkürzung der Chromosomen bewirkt, scheint Condensin I erst später an die Chromosomen rekrutiert zu werden und eine weitere laterale Kompaktierung zu vermitteln (Green et al., 2012; Shintomi and Hirano, 2011).

1.5.3 Mechanismen der Chromatin-Strukturierung durch Condensin

Lange Zeit herrschte Unklarheit über die Natur der Interaktion zwischen Condensin und seinem natürlichen Substrat, dem Chromatin. Mittlerweile jedoch gilt es als erwiesen, dass Condensin doppelsträngige DNA ringförmig umschließen kann (Cuylen et al., 2011; Wilhelm et al., 2015). Experimente an Minichromosomen zeigen, dass die artifizielle Öffnung der Condensin-Ringstruktur durch proteolytische Spaltung einzelner Untereinheiten zu einer Ablösung von der DNA führt. Umgekehrt führt die Linearisierung der Minichromosomen zur Dissoziation von Condensin (Cuylen et al., 2011). Die topologische Art der Chromatinbindung bildet die Grundlage für die Formation großer Chromatinschlaufen. Unbeantwortet bleibt dabei jedoch der Aspekt wie die DNA-Stränge in das Innere des dreigliedrigen Condensin-Ringes gelangen. Ein vorstellbares Szenario wäre ein Wirkprinzip ähnlich dem des Cohesin-Komplexes. Im Fall des Cohesin-Komplexes geschieht dies durch Öffnung des Ringes infolge transienter Dissoziation jeweils einer der drei Protein-Interaktionsflächen. Die Schwesterchromatiden gelangen durch Öffnung der Interaktionsfläche zwischen der Kleisin-Untereinheit Scc1 und der Kopfdomäne von Smc3 in den Ring und verlassen diesen ebenfalls über diese Kontaktstelle (Buheitel and Stemmann, 2013; Murayama and Uhlmann, 2015). Es ist denkbar, dass derartige DNA-Eintritts- und Austrittsstellen (*“gates”*) auch im Fall von Condensin existieren. Konsistent damit sind Beobachtungen anhand von bakteriellem Condensin, wonach die ATP-abhängige Assoziation der beiden Kopfdomänen der SMC-Untereinheiten eine transiente Öffnung des Ringes durch Lösen der SMC-Kleisin-Interaktion bewirkt (Woo et al., 2009).

Gereinigte Condensin-Komplexe binden unterschiedliche DNA-Substrate *in vitro* (Kimura and Hirano, 1997; Strick et al., 2004). Während die intrinsischen DNA-Bindeaktivitäten der einzelnen Untereinheiten scheinbar ausreichend sind um “nackte” DNA zu binden (Kimura and Hirano, 1997), scheinen für eine stabile Assoziation von Condensin mit dem Chromatin die ATPase-Kopfdomänen eine zentrale Rolle zu spielen. In zwei unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Einführen von ATP-Bindemutationen in die hochkonservierten *Walker A* bzw. *Walker B* Motive von SMC2 und SMC4 die Bindung von Condensin an Chromosomen inhibiert (Hudson et al., 2008; Kinoshita et al., 2015). Die Unterdrückung der ATP-Hydrolyse hingegen erlaubt zwar das Laden von Condensin an die Chromosomen, resultiert jedoch in einer abnormalen Struktur der Chromosomen (Kinoshita et al., 2015). Somit scheint die ATP-Bindung für das korrekte Laden von Condensin verantwortlich zu sein, während die ATP-Hydrolyse für die Etablierung einer höhergeordneten Chromosomenstruktur essentiell ist. Um diese Befunde zusammen mit der Tatsache, dass Condensin DNA-Stränge topologisch umschließt, mechanistisch zu vereinigen, braucht es ein detaillierteres Verständnis von den unmittelbaren Auswirkungen der ATP-Bindung und Hydrolyse auf die Molekülgeometrie des Condensin-Komplexes. Ausgehend von Mutageneseexperimenten der ATPase-Domänen konnte ein universeller ATPase-Zyklus für die SMC-Proteine beschrieben werden. Die Bindung von ATP (jeweils ein Molekül ATP pro SMC-Protein) führt, bedingt durch eine erhöhte Bindeaffinität, zur Assoziation der beiden Kopfdomänen des SMC-Dimers. Dieser Schritt triggert die Hydrolyse der ATP-Moleküle, was wiederum die neuerliche Dissoziation der beiden Kopfdomänen bewirkt (Hirano et al., 2001; Hirano, 2006). Die ATP-Bindung vermittelt zugleich eine konformationelle Reorganisation innerhalb der *coiled coil* Bereiche der SMC-Proteine und damit eine übergreifende Umordnung der Molekülgeometrie von Condensin (Diebold-Durand et al., 2017; Minnen et al., 2016). Diese Konformationsänderung bildet die Grundlage für eine stabile Bindung an die DNA und liefert zugleich den „Motor“ für die Ausbildung von Chromatinschlaufen. Verschiedene Befunde unterstützen die Hypothese, dass die dreidimensionale Organisation eukaryontischer Chromosomen maßgeblich durch die Extrusion von DNA-Schlaufen vermittelt wird (Goloborodko et al., 2016; Naumova et al., 2013). Anhand des sogenannten *loop extrusion*-Modells können Form, mechanische Eigenschaften und Kompaktierungsgrad mitotischer Chromosomen erklärt werden (Marko, 2008; Marko and Siggia, 1997; Zhang and Heermann, 2011). Kürzlich konnte eine neuartige Modellvorstellung postuliert werden,

welche die Formation von Chromatinschleifen in Relation zum ATPase-Zyklus beschreibt (Abb. 6). Diese beruht auf der Annahme, dass Condensin als eine Art Doppelkammer-SMC-Komplex fungiert. Das Modell stützt sich auf Daten, die nahe legen, dass die *in vivo* vorherrschende Form von Condensin eine gerade stäbchenförmige Struktur ist, bei der die beiden ATPase Kopfdomänen zwar nebeneinander, aber in falscher Orientierung zueinander liegen. Durch die Assoziation der beiden Kopfdomänen, welche die Energie der ATP-Bindung nutzt, wird ein konformationeller Wechsel der Kopfdomänen und infolgedessen der Übergang zu einer offenen, ringförmigen Konformation des SMC-Komplexes bewirkt. In dieser offenen Form, wird der Eintritt von Chromatinschleifen in den Interarm-Raum zwischen beiden SMC-Proteinen, die sogenannte „Pro-Kammer“, ermöglicht.

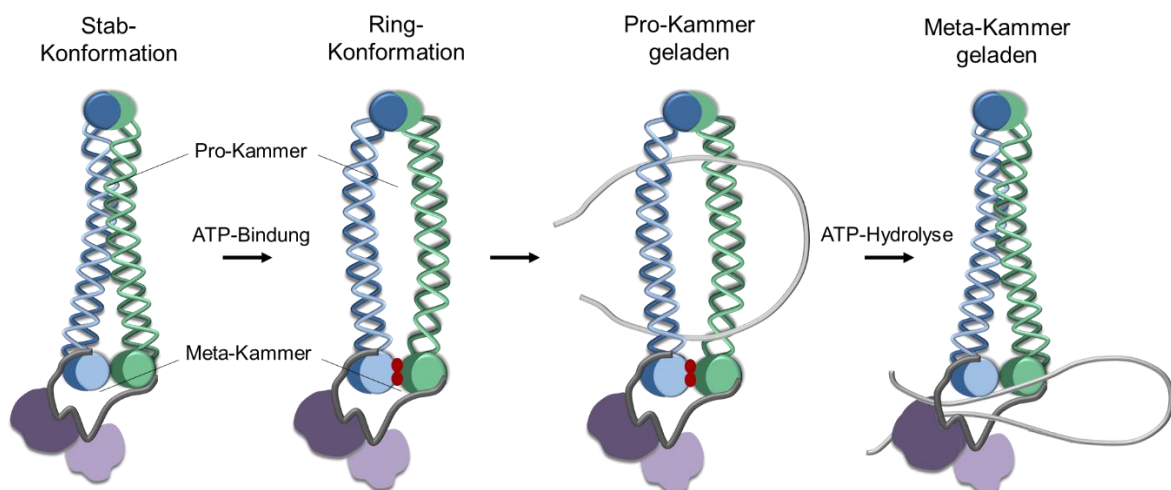


Abbildung 6 | Aktuelles Modell der Wirkungsweise des Condensin-Komplexes bei Ladung von DNA-Strängen und Extrusion von DNA-Schleifen. Condensin-Komplexe liegen unter den physiologischen Bedingungen der Zelle präferentiell in einer stäbchenförmigen Konformation vor, bei der die *coiled-coil* Domänen beider SMC-Proteine entlang ihrer gesamten Länge Seite-an-Seite eng aneinander liegen. Die Bindung zweier ATP-Moleküle durch die Kopfdomänen vermittelt eine konformationelle Transformation der SMC-Proteine und bewirkt den Übergang in eine ringförmige Struktur. In der offenen Ring-Konformation können DNA-Stränge in der Pro-Kammer des Komplexes eingefangen und geladen werden. ATP-Hydrolyse führt zur Destabilisierung der ringförmigen Konformation und infolgedessen zur Wiederherstellung der geschlossenen Konformation. Durch diese erneute Konformationsänderung wird die Pro-Kammer zwischen den Armen der SMC-Proteine geschlossen und der DNA-Strang aktiv in die Meta-Kammer zwischen den Kopfdomänen und der Kleisin-Untereinheit transportiert. Modifiziert nach Diebold-Durant et al., 2017.

Durch anschließende ATP-Hydrolyse und Dissoziation der Kopfdomänen wird die Ringstruktur von Condensin destabilisiert und die Rückkehr in die geschlossene Stabstruktur

begünstigt. Der Interarm-Raum schließt sich und der Chromatinstrang wird in die sogenannte „Meta-Kammer“ zwischen SMC-Kopfdomänen und Kleisin transloziert (Diebold-Durand et al., 2017).

Condensin-Komplexe besitzen nachweislich zwei experimentell charakterisierte enzymatische Aktivitäten, die zum Teil auf der DNA-stimulierten ATPase Aktivität der SMC-Proteine beruhen. Eine von beiden ist die Befähigung (ATP-unabhängig) komplementäre, einzelsträngige DNA in doppelsträngige DNA zu konvertieren (Akai et al., 2011; Sakai et al., 2003) (Abb. 7).

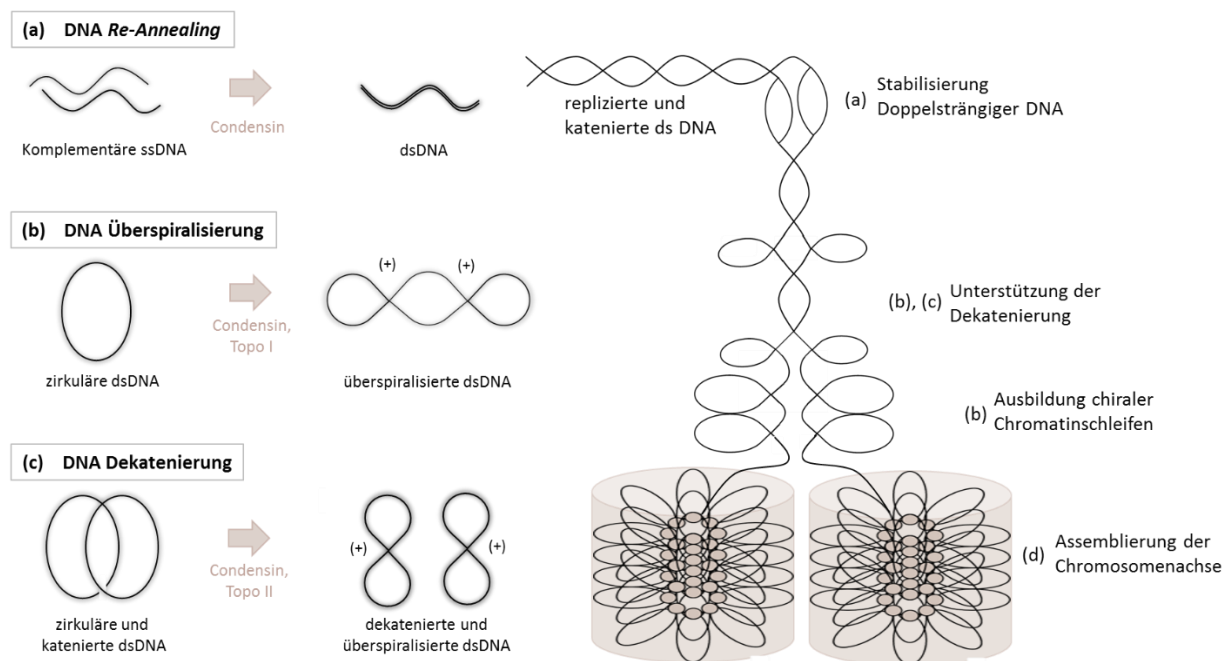


Abbildung 7 | Übersicht über die enzymatischen Aktivitäten des Condensin-Komplexes und deren Einfluss auf die Assemblierung mitotischer Chromosomen. (a) Mittels seiner intrinsischen DNA *Re-Annealing*-Aktivität ist Condensin in der Lage komplementäre ssDNA in dsDNA zu konvertieren. Die Stabilisierung der dsDNA ist vermutlich eine Voraussetzung für nachfolgende Strukturierungsprozesse. (b) Condensin verursacht ATP-abhängig positive Überspiralisierung zirkulärer dsDNA. (c) Die Einführung positiver, superhelikaler Spannung in katenierte DNA der Schwesterchromatiden begünstigt die Dekatenierung durch Topoisomerase II und damit die Auflösung der beiden Schwesterchromatiden. (d) Die Oligomerisierung mehrerer Condensin-Komplexe stabilisiert eine weitere Aufwindung der Chromatinschleifen zu einer höher geordneten Struktur und definiert vermutlich die Ausbildung der proteinreichen Chromosomenachse. Modifiziert nach Hirano, 2012.

Möglicherweise stellt diese *Re-Annealing*-Aktivität einen präparativen Schritt für nachfolgende Strukturierungsprozesse des Chromatins dar (Hirano, 2012; Sutani et al.,

2015). Am prominentesten dagegen ist jedoch die Fähigkeit von Condensin ATP-Hydrolyse-abhängig DNA strukturell zu rekonfigurieren. So ist Condensin in der Lage in Anwesenheit von Topoisomerase Typ I positive Überspiralisierungen in relaxierte, zirkuläre DNA einzuführen (Kimura and Hirano, 1997) (Abb. 7), eine konservierte Fähigkeit die neben *X. laevis* bereits in einer Reihe weiterer eukaryontischer Spezies charakterisiert werden konnte (Hagstrom et al., 2002; Kimura et al., 2001; St-Pierre et al., 2009). Durch das Potential multiple Überspiralisierungen in einer geordneten, solenoiden Form zu organisieren (Kimura et al., 1999) ist Condensin in der Lage chirale Chromatinschleifen in den DNA-Strängen der beiden Schwesterchromatiden zu assemblieren und damit eine höher geordnete Strukturierung der Chromatinfasern zu begünstigen (Swedlow and Hirano, 2003). Um die Chromatinschleifen in der für mitotische Chromosomen charakteristischen, stäbchenförmigen Struktur zu assemblieren bedarf es weiterer Strukturierungsprozesse. Gemäß der favorisierten Modellvorstellung führen Interaktionen zwischen benachbarten Condensin-Komplexen zu deren Oligomerisierung und zur Formation der proteinreichen Achse ("*scaffold*") mitotischer Chromosomen (Abb. 7) (Swedlow and Hirano, 2003). Tatsächlich gibt es erste Hinweise auf die Eigenschaft von Condensin Multimere zu assemblieren (Badrinarayanan et al., 2012; Barysz et al., 2015; Fuentes-Perez et al., 2012; Keenholz et al., 2017). Durch *single molecule*-Mikroskopie des bakteriellen MukBEF Komplexes konnte eine punktförmige Akkumulation 8-10 einzelner Condensin-Komplexe beobachtet werden (Badrinarayanan et al., 2012). Ein weiterer Anhaltspunkt für das Vorhandensein von Condensin-Oligomeren ist das Auftreten von höhermolekularen Banden in Präzipitationsexperimenten unter nativen Bedingungen (Barysz et al., 2015).

Eine weitere elementare Funktion der Condensin-vermittelten Überspiralisierung der DNA ist die Stimulation der Dekatenierung durch Topoisomerase II (Abb. 7). Katenierte und positiv überspiralisierte Plasmide erlauben eine weitaus effizientere Auflösung von DNA-Katenierungen durch Topoisomerase II als jene ohne Überspiralisierung (Baxter et al., 2011; Charbin et al., 2014). Konsistent damit sind Beobachtungen in Bäckerhefe und *D. melanogaster*, wonach die Lokalisation von Condensin die Rekrutierung von Topoisomerase II entlang der zentralen Chromosomenachse begünstigt (Coelho et al., 2003; Leonard et al., 2015). Die enorme Bedeutung von Condensin auf die Topoisomerase-abhängige Auflösung von Katenierungen zwischen zwei Schwesterchromatiden zeigt sich insbesondere an den Phänotypen, die aus der Inaktivierung der Condensin-Komplexe

resultieren. Nach Depletion von Condensin kommt es zu schwerwiegenden Defekten während der Chromosomensegregation in Anaphase, was sich häufig durch das Auftreten von Chromatinbrücken zwischen den segregierenden Chromosomen äußert (Bhat et al., 1996; Green et al., 2012; Hagstrom et al., 2002; Savvidou et al., 2005).

1.5.4 Regulation von Condensin

Das breite Spektrum an diversen Funktionen zum einen und das charakteristische, Zellzyklus-abhängige Lokalisationsverhalten zum anderen setzen die Existenz eines elaborierten Regulationssystems voraus, welches die Aktivität von Condensin strikt reguliert. Ein fundamentales Prinzip bei der Regulation der Proteinaktivität stellen dabei posttranslationale Modifikationen dar, insbesondere durch Phosphorylierung. Condensin liegt während des gesamten Zellzyklus in einem konstitutiv phosphorylierten Zustand vor, wobei die Phosphorylierungsmuster zwischen Interphase und Mitose deutlich variieren (Hirano et al., 1997; Takemoto et al., 2004). Bisher konnten einige wenige Faktoren identifiziert werden, welche die Unterschiede im Phosphorylierungsmuster steuern und die Aktivität von Condensin positiv oder negativ beeinflussen. Dazu gehören die mitotischen Kinasen Cdk1, Plk (*Polo-like kinase*) und Aurora B Kinase sowie die Kinase Ck2 (*Casein kinase 2*) (Hirano, 2012; Piazza et al., 2013). Für die Regulation der Condensin-Aktivität in Mitose wird ein mehrstufiges Modell postuliert, welches die Initiierung und die Aufrechterhaltung des kondensierten Status mitotischen Chromatins bis zum Austritt aus der Mitose gewährleistet (Bazile et al., 2010). Demnach führt die Cdk1-abhängige Phosphorylierung beim Eintritt in die Mitose zu einer initialen Aktivierung des Condensin-Komplexes (Bazile et al., 2010). Die Mitose-spezifische Phosphorylierung durch Cyclin B/Cdk1 konnte in mehreren Spezies, darunter Hefe und Mensch, nachgewiesen werden (Abe et al., 2011; Kimura et al., 1998; St-Pierre et al., 2009; Sutani et al., 1999; Übersax et al., 2003). So konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die frühe Phase der Chromosomenkondensation die Phosphorylierung von CapD3 an Position T1415 durch Cdk1 erfordert (Abe et al., 2011). Um Condensin auch nach dem Metaphase-Anaphase-Übergang, zu dem die Cdk1-Aktivität rapide abnimmt, in einem aktiven Zustand zu erhalten, ist die Phosphorylierung durch (eine) weitere Kinase(n) erforderlich. Diese Funktion wird mutmaßlich von Plk1 übernommen (Bazile et al., 2010). Unterstützende Daten stammen aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Eine Plk (Cdc5)-abhängige Phosphorylierung der drei nicht-SMC-Untereinheiten von Condensin in

früher Anaphase vermittelt die ordnungsgemäße Kondensation von rDNA-loci *in vivo* (St-Pierre et al., 2009). In Interphase schließlich wird Condensin durch Ck2-abhängige inhibitorische Phosphorylierung (und gleichzeitig durch ein niedriges Cdk1-Level) inaktiviert, um vorzeitige Chromosomenkondensation zu verhindern (Takemoto et al., 2006). Darüber hinaus häufen sich Indizien aus verschiedenen Modellorganismen, welche eine Rolle von Aurora B Kinase, neben ihrer Funktion bei der Regulation der Spindeldynamik, als Modulator der Condensin-Aktivität beschreiben. In *D. melanogaster* (Giet and Glover, 2001), *C. elegans* (Collette et al., 2011; Kaitna et al., 2002), *X. laevis* (Takemoto et al., 2007), *S. pombe* (Tada et al., 2011) sowie humanen Zellen (Lipp et al., 2007) können signifikante Effekte von Aurora B Kinase auf die Rekrutierung und chromosomale Lokalisation von Condensin beobachtet werden. Das Ausmaß der Aurora B-abhängigen Regulation jedoch variiert deutlich zwischen unterschiedlichen Spezies und Zelltypen. In *D. melanogaster* führt die Depletion von Aurora B zu signifikanten Defekten bei der Chromatinassoziation von Condensin mit mitotischen Chromosomen (Giet and Glover, 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden auch nach Inaktivierung von Aurora B in *S. pombe* und HeLa-Zellen gemacht (Tada et al., 2011). Im Gegensatz dazu ist die Aurora B- abhängige Modifikation von Ycg1 (CapG) in Bäckerhefe für das Laden von Condensin an das Chromatin nicht notwendig, dennoch aber für korrekte Kompaktierung der rDNA Bereiche (Lavoie et al., 2004).

Neben der Phosphorylierung der einzelnen Condensin Untereinheiten gibt es Hinweise auf das Vorhandensein weiterer posttranslationaler Modifikationen, wie Acetylierung und Sumoylierung (Bachellier-Bassi et al., 2008; Bazile et al., 2010). Die funktionelle Relevanz dieser Modifikationen ist jedoch bislang unklar.

Die Regulation des Proteinlevels innerhalb der Zelle stellt einen weiteren Regulationsmechanismus der Proteinaktivität dar. Durch Veränderungen des Gleichgewichts zwischen Proteinexpression und Degradation können zeit- und gewebespezifisch unterschiedliche Proteinlevel geschaffen werden und die Proteinaktivität so zellübergreifend gesteigert oder verringert werden. Tatsächlich gibt es auch im Fall von Condensin erste Hinweise auf derartige Regulationsmechanismen. Einzelne Condensin-Untereinheiten können ubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden. Die Condensin II-Untereinheit CapH2 wird nachweislich über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Buster et al., 2013; Kagami et al., 2017). Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass das zelluläre Proteinlevel von CapH2 während des Zellzyklus fluktuiert und durch Plk1-abhängige

Phosphorylierung positiv reguliert wird (Kagami et al., 2017). Dabei besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der Abundanz einzelner Untereinheiten und der Aktivität von Condensin. Ein Blockieren des CapH2 Abbaus führt folglich zu einer partiellen Chromosomenkondensation in Interphase (Buster et al., 2013). Auch das Proteinlevel der Untereinheit Ycg1 (CapG) unterliegt Zellzyklus-anhängigen Schwankungen und stellt einen limitierenden Faktor für die Komplexbildung und folglich die effektive Menge an aktiven Condensin-Komplexen dar (Doughty et al., 2016).

1.5.5 Funktionsspektrum der Condensin-Komplexe

Beide Condensin-Komplexe sind maßgeblich an der Strukturierung mitotischer Chromosomen beteiligt. Jedoch sind sie, mit Ausnahme von *X. laevis*-Eiextrakten (Hirano et al., 1997; Hirano and Mitchison, 1994), für den Vorgang der Chromosomenkondensation *per se* nicht essentiell. Trotz Depletion einzelner Condensin-spezifischer Untereinheiten ist die Kompaktierung des Chromatins nur unwesentlich beeinträchtigt, wenngleich die resultierenden Chromosomen eine abnormale Morphologie aufweisen (Hudson et al., 2003; Jager et al., 2005; Ono et al., 2003; Savvidou et al., 2005; Steffensen et al., 2001). Diese Beobachtungen suggerieren die Existenz alternativer Condensin-unabhängiger Mechanismen für die Chromosomen-kompaktierung. Dahingegen führt die Inaktivierung von Condensin in allen untersuchten Fällen zu einer aberranten Chromosomensegregation in Anaphase (Bhat et al., 1996; Green et al., 2012; Hagstrom et al., 2002; Jager et al., 2005; Savvidou et al., 2005). Als Ursache für die Entstehung von Anaphasebrücken in Zellen ohne funktionelles Condensin können zwei grundsätzliche Szenarien in Betracht gezogen werden. Entweder ist die fehlerhafte Chromosomensegregation das Resultat einer insuffizienten DNA-Dekatenierung durch Topoisomerase II und somit einer ungenügenden Individualisierung der Schwesterchromatide (Bhat et al., 1996; Coelho et al., 2003) oder aber das Ergebnis einer beeinträchtigten strukturellen Integrität der Chromosomen. Durch die defekte Organisation als Resultat der Condensin-Depletion verlieren die mitotischen Chromosomen wichtige mechanische Eigenschaften. Eine erhöhte Elastizität würde schließlich dazu führen, dass die Chromosomenarme gedehnt und nicht ordnungsgemäß auseinandergezogen werden, wenn die Centromere zu entgegengesetzten Spindelpolen gezogen werden (Cuylen et al., 2011; Gerlich et al., 2006). Gleichzeitig werden die Chromosomen weniger robust gegenüber den

Zugkräften der Mitosespindel, was erhebliche DNA-Schäden zur Folge haben kann (Gerlich et al., 2006). Darüber hinaus kann die gestörte Chromosomensegregation im Condensin-depletierten Hintergrund durch den fehlenden positiven Einfluss von Condensin auf die Ablösung der Cohesin-Komplexe vom Chromatin begründet werden. Bei Eintritt in die Anaphase werden die meisten Cohesin-Komplexe durch gezielte Proteolyse von den Centromeren der Schwesterchromatiden entfernt, um deren Trennung zu gewährleisten (Nasmyth and Schleiffer, 2004). Einige Cohesin-Komplexe entkommen dabei jedoch der Separase-abhängigen, proteolytischen Spaltung und bleiben bisweilen mit dem Chromatin assoziiert, wodurch eine „Rest“-Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden bestehen bleibt. Durch die Condensin-abhängige Chromosomenspiralisierung in den betroffenen Bereichen werden physikalische Kräfte generiert, welche die komplette Dissoziation überschüssiger Cohesin-Komplexe begünstigen (Hirota et al., 2004; Renshaw et al., 2010). Diese persistierende „Rest“-Kohäsion könnte für Anaphase-Brücken nach Condensin-Depletion verantwortlich sein.

Es zeichnet sich ab, dass Condensin zusätzlich ein breites Spektrum nicht-mitotischer Funktionen erfüllt. So scheinen die Condensin-Komplexe auch einen Einfluss auf die Organisation des Interphasechromatins zu nehmen. Jedoch handelt es sich dabei, anders als in Mitose, nicht um eine Genom-übergreifende, als vielmehr um eine lokal begrenzte Aktivität von Condensin an spezifischen, genomischen *Loci*. Die Modulation der Chromatinstruktur stellt einen wichtigen Mechanismus der Regulation der Genexpression dar. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Condensin-abhängigen Chromosomentopologie und der Regulation der Genfunktion wurde ursprünglich in *C. elegans* durch die Entdeckung eines dritten, Condensin I-ähnlichen Komplexes (Condensin I^{DC}) demonstriert. Dieser Condensin I-ähnliche Dosiskompensationskomplex vermittelt die Transkriptionsrepression X-chromosomal lokalisierter Gene (Chuang et al., 1994). In *D. melanogaster* ist Condensin erwiesenermaßen in den Prozess der Positioneffekt-Variegation (PEV) involviert. Mutante Allele Condensin-spezifischer Untereinheiten sind in der Lage die Positioneffekt-Variegation zu verstärken oder zu supprimieren (Cobbe et al., 2006; Dej et al., 2004) und die Stilllegung homeotischer Gene zu beeinflussen (Lupo et al., 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Condensin II-Komplex in *D. melanogaster* trans-chromosomale Inter-aktionen reguliert und auf diese Weise der Transvection entgegenwirkt, einem Phänomen, bei dem bestimmte Allele eines

Gens durch Assoziation mit ihrem homologen Genlocus transkriptionell beeinflusst werden (Hartl et al., 2008a). Weitere Hinweise auf die Beteiligung von Condensin an der Regulation der Genexpression stammen aus verschiedenen Modellorganismen, darunter Hefe (Haeusler et al., 2008; Iwasaki et al., 2010), und verschiedenen proliferierenden Zelltypen wie T-Zellen und Erythrozyten (Rawlings et al., 2011; Xu et al., 2006).

Der Condensin verwandte Smc5/6-Komplex spielt eine substanzielle Rolle bei der DNA Reparatur. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit beider SMC-Komplexe ist es nicht überraschend, dass auch für Condensin eine Beteiligung an zellulären DNA-Reparaturmechanismen und der Erhaltung der genetischen Stabilität beschrieben wurde (Wu and Yu, 2012). Temperatur-sensitive Mutanten der Kleisin-Untereinheit Cnd2 in *S. pombe* weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, wie UV, Hydroxyharnstoff (HU) sowie Methylmethansulfonat (MMS) auf (Aono et al., 2002). Im humanen System können differentielle Funktionen der Condensin Komplexe I und II beobachtet werden. Während Condensin I einen nachweislichen Effekt auf die Reparatur von DNA Einzelstrangbrüchen hat (Heale et al., 2006; Kong et al., 2011), ist Condensin II in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen involviert (Wood et al., 2008).

Ähnliche Funktionen von Condensin wie die in Mitose, konnten auch in meiotischen Zellen identifiziert werden. In beiden meiotischen Teilungen können nach Condensin-Depletion vergleichbare Effekte auf die Chromosomenkompaktierung sowie -segregation festgestellt werden (Hagstrom et al., 2002; Hartl et al., 2008b; Siddiqui et al., 2003; Yu and Koshland, 2003). In Maus-Oocyten scheint dafür lediglich Condensin II von funktioneller Relevanz zu sein, nicht jedoch der kanonische Condensin I-Komplex. Zwar weisen CapH depletierte Oocyten atypisch aussehende Chromosomen auf, deren Segregation verläuft jedoch normal. Der Verlust von CapH2 dagegen führt zu einer unvollständigen Kondensation der Chromosomen sowie zu massiven Fehlern bei der Trennung der homologen Chromosomen in Anaphase I (Houlard et al., 2015).

Zwei der bekannten Condensin-Komplexe in *C. elegans* sind beteiligt an der Regulation von *Crossing-over* Ereignissen zwischen homologen Chromosomen. Die Inaktivierung beider Komplexe führt zu einer erhöhten Anzahl und zugleich zu einer fehlerhaften Verteilung von Doppelstrangbrüchen entlang der Chromosomenarme (Mets and Meyer, 2009; Tsai et al., 2008). Diesbezüglich wird angenommen, dass die Position von Doppelstrangbrüchen wesentlich durch die Struktur des Chromatins beeinflusst wird. Eine weitere Meiose-

spezifische Funktion von Condensin wurde unabhängig voneinander sowohl in *D. melanogaster* als auch in *S. cerevisiae* identifiziert. Beide Studien demonstrieren einen Effekt von Condensin auf die Assemblierung bzw. Disassemblierung des Synaptonemalen Komplexes (Resnick et al., 2009; Yu and Koshland, 2003). Ein Großteil dieser in Meiose beschriebenen Funktionen von Condensin basiert auf experimentellen Daten im Modellsystem der weiblichen Meiose. Gleichwohl ist die physiologische Relevanz von Condensin in der männlichen Meiose nur unzureichend beschrieben. Eine der wenigen Studien hierzu stammt aus *Drosophila melanogaster*. Demnach besitzt der mutmaßliche Condensin II-Komplex einen essentiellen Einfluss auf die Assemblierung des Chromatins in Form von Chromatinterritorien in Prophase I. Condensin II-mutante Individuen sind steril und produzieren eine erhöhte Anzahl aneuploider Spermien als Folge einer beeinträchtigten Chromosomensegregation (Hartl et al., 2008b).

1.5.6 Medizinische Relevanz der Condensin-Komplexe

Da Condensin I und II vielseitige Funktionen in vielen wichtigen Prozessen im Verlauf des gesamten Zellzyklus beeinflussen, können sich als Folge einer Dysfunktion beider Komplexe diverse klinische Symptome manifestieren. Aufgrund ihrer diffizilen Rolle bei der Assemblierung und anschließenden Segregation der Chromosomen in Mitose wurde lange Zeit vermutet, dass die Fehlfunktion von Condensin genomische Instabilität und Tumorentstehung begünstigt. Genomische Instabilität ist eines der Hauptcharakteristika von Krebs. Darmkrebs ist eine der am häufigsten auftretenden bösartigen Krebsarten mit etwa 1,2 Millionen Neuerkrankungen und 600 000 Todesfällen pro Jahr weltweit (Brenner et al., 2014). Tatsächlich demonstriert eine kürzlich erschienene Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expressionsrate der Kleisin-Untereinheit CapH von Condensin I mit der Pathologie von Darmkrebs (Yin et al., 2017). Entartete Darmkrebszellen weisen eine um ein Vielfaches höhere Expression von CapH auf als normale Darmepithelzellen. Konsistent damit kann durch Depletion von CapH in diesen Zellen deren Proliferation und Migration inhibiert und gleichzeitig der apoptotische Zelltod sowie Zellzyklusarrest am G2/M Übergang induziert werden (Yin et al., 2017). Gleichzeitig belegt eine zweite, unabhängige Studie eine Korrelation zwischen der Überexpression der Condensin II-spezifischen Untereinheit CapG2 und der Entstehung von Lungenkarzinomen (Zhan et al., 2017). In ähnlicher Weise wie die fehlerhafte Chromosomensegregation in Mitose zu genomischer

Instabilität führt, begünstigen Chromosomensegregationsdefekte in Meiose die Ausbildung aneuploider Keimzellen. Numerische Chromosomenaberrationen in Keimzellen sind die Hauptursache für schwerwiegende Erbkrankheiten wie etwa Trisomie 21 (*Down-Syndrom*). Ein direkter Nachweis für eine Fehlfunktion von Condensin als Ursache derartiger vererbter Aneuploidien ist jedoch noch nicht bekannt.

Dahingegen existieren Hinweise auf die Manifestation massiver Entwicklungsstörungen als Resultat Condensin-betreffender Gendefekte. Biallelische Mutationen in den für CapH, CapD2 und CapD3 kodierenden Genen verursachen Microcephalie (Martin et al., 2016). Die primäre Microcephalie ist eine neuronale Entwicklungsstörung des Menschen und äußert sich durch einen auffällig verringerten Kopfumfang aufgrund einer Fehlentwicklung des Gehirns sowie geistige Retardierung der betroffenen Patienten (Thornton and Woods, 2009). Erste wegweisende Anhaltspunkte, um ein besseres Verständnis der Ätiologie dieser Krankheit zu erlangen, stammen aus zellfreien *X. laevis* Eiextrakten. Die N-terminale Domäne von MCPH1 (microcephalin 1) fungiert als kompetitiver Bindepartner von Condensin II um die chromosomalen Bindestellen und inhibiert dessen Aktivität *in vitro* (Yamashita et al., 2011). MCPH1 wird während der fötalen Gehirnentwicklung exprimiert und determiniert maßgeblich die Größe der Großhirnrinde (Jackson et al., 2002). Die physikalische Interaktion von MCPH1 und Condensin suggeriert ein potentielles Zusammenspiel beider Komponenten innerhalb eines zellulären Signalnetzwerks, dessen Fehlregulation die Pathogenese von Microcephalie beeinflusst.

1.5.7 Besonderheiten der Condensin-Komplexe in *Drosophila melanogaster*

Während Condensin I unter allen eukaryontischen Spezies ubiquitär verbreitet zu sein scheint, konnten in einigen Invertebraten, darunter *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *N. crassa*, bislang keine Condensin II-spezifischen Proteine nachgewiesen werden (Hirano, 2012). In *D. melanogaster* konnten zwar Homologe für die Condensin II-spezifischen Untereinheiten CapD2 und CapD3 identifiziert werden, jedoch nicht für CapG2. Lange Zeit wurde deswegen spekuliert, dass *Drosophila* CapG, ähnlich wie SMC2 und SMC4, eine integrale Komponente beider Condensin-Komplexe sei. Protein-Interaktionsstudien lieferten jedoch keinerlei Hinweise auf eine Assoziation von CapG mit Condensin II-spezifischen Proteinen (Herzog et al., 2013). Darüber hinaus war es, im Gegensatz zu Condensin I, nicht möglich durch Immunpräzipitation das Vorhandensein eines Condensin II-Komplexes eindeutig zu zeigen

(Herzog et al., 2013). Dies wirft Zweifel an der Existenz eines abundanten und löslichen Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* auf (Herzog et al., 2013). Überdies scheint sich der mutmaßliche Condensin II-Komplex hinsichtlich seiner physiologischen Funktion deutlich von dem der Vertebraten zu unterscheiden. *Loss-of-function* Mutationen in den für CapD3 und CapH2 kodierenden Genen haben weder einen nachweislichen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Fliegen *per se* noch auf die mitotische Progression (Savvidou et al., 2005). Folglich scheint Condensin II in *D. melanogaster* entbehrlich für Mitose zu sein. Allerdings erfüllt es mutmaßlich eine essentielle Funktion in der männlichen Meiose (Hartl et al., 2008b). Diese besondere Aufgabenteilung der Condensin-Komplexe spiegelt die Situation in der primitiven Rotalge *C. merolae* wieder, bei der Condensin I eine Schlüsselrolle in Mitose spielt, während Condensin II für Meiose essentiell zu sein scheint (Fujiwara et al., 2013).

Unter allen Condensin-Untereinheiten weist *Drosophila* CapG eine auffällige Besonderheit auf. Im Rahmen von *in vivo* Analysen Fluoreszenz-markierter Condensin-Untereinheiten in syncytialen *D. melanogaster*-Embryonen stellte sich heraus, dass CapG ein von den anderen Condensin I-spezifischen Proteinen abweichendes Lokalisationsverhalten aufweist. Während CapD2 und CapH/Barren in Interphase cytoplasmatisch angereichert sind, ist CapG während dieser Zellzyklusphase bereits präferentiell im Zellkern lokalisiert und kann folglich schon vor NEBD am Chromatin nachgewiesen werden (Herzog et al., 2013; Oliveira et al., 2007). Dies wirft die Frage nach einer vom Condensin I-HoloKomplex unabhängigen Funktion von CapG auf. Die physiologische Relevanz dieses außerordentlichen Lokalisationsmusters von CapG muss jedoch noch hinreichend untersucht werden.

1.6 Zielsetzung

Die beiden Condensin-Komplexe, Condensin I und Condensin II, sind evolutionär hoch konservierte Proteinkomplexe mit essentiellen Funktionen im Chromosomenmetabolismus einer Zelle. Zu ihren fundamentalen Aufgaben gehört die Strukturierung des Chromatins in Mitose und Meiose. Mitose- und Meiose-spezifische Funktionen beider Condensin-Komplexe konnten in allen bedeutsamen Modellorganismen, darunter *D. melanogaster*, beschrieben werden. Lediglich die Rolle von Condensin I in der männlichen Meiose von *D. melanogaster* ist bislang gänzlich unbekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse und Charakterisierung potentieller Funktionen des kanonischen Condensin I-Komplexes während der männlichen Keimzellbildung in *D. melanogaster*. Im ersten Teil der Arbeit sollte das kürzlich entwickelte CRISPR/Cas-System etabliert werden, um Fluoreszenz-markierte Condensin-Untereinheiten durch EGFP-Fusion an deren endogenen Genloci zu erzeugen. Im Fokus stand dabei zunächst die Validierung und Optimierung eines robusten Screening-Verfahrens um positive HDR-Ereignisse eindeutig identifizieren zu können. Die mittels CRISPR/Cas erzeugten EGFP-Allele sollten, neben herkömmlichen EGFP-markierten Transgenen, als Werkzeuge für weiterführende Lokalisations- sowie Funktionsanalysen herangezogen werden. Durch *in vivo* Mikroskopie der meiotischen Teilungen sollte das spezifische Lokalisationsprofil sowie eine mögliche Chromatinassoziation einzelner Condensin-Untereinheiten untersucht werden. Im Falle einer nachweislichen Assoziation mit dem meiotischen Chromatin sollte die zugrundeliegende Dynamik in FRAP-Experimenten detailliert betrachtet werden. Für die funktionelle Analyse des Condensin I-Komplexes sollte dieser in der männlichen Keimbahn gezielt inaktiviert und die Auswirkungen unter Verwendung genetischer und molekularbiologischer Methoden phänotypisch charakterisiert werden. Durch RNAi-vermittelten Abbau sollte eine gewebespezifische und effiziente Depletion der Condensin-Untereinheiten SMC2, CapG und Barren erzielt werden. Genetisch sollten die männlichen Individuen zunächst auf ihre Fertilität hin untersucht werden. Eine durch den *knockdown* hervorgerufene Sterilität ließe auf eine essentielle Funktion von Condensin I bei der männlichen Keimzellbildung schließen. Fertile bzw. subfertile Männchen sollten durch klassische *Nondisjunction*-Analysen auf eine erhöhte Rate chromosomaler Fehlsegregationen während der meiotischen Teilungen überprüft werden. Schließlich sollten einzelne Stadien der Keimzellbildung durch cytologische Betrachtung detailliert analysiert werden. Das

Hauptaugenmerk sollte dabei auf die Formation der chromosomalen Territorien in Prophase I sowie die meiotische Chromosomensegregation gelegt werden, da für diese Prozesse eine Beteiligung des paralogen Condensin II-Komplexes bereits beschrieben ist.

2 Ergebnisse

2.1 Etablierung der CRISPR/Cas-Methode zur gezielten Genommanipulation in *D. melanogaster*

Die Fusion mit fluoreszierenden Markerproteinen ist ein wertvolles molekularbiologisches Instrument, um die Lokalisation und Dynamik von Proteinen innerhalb der Zelle zu verfolgen. Zwar existieren bereits etablierte, transgene Fliegenstämme, welche die Expression EGFP-markierter Condensin-Untereinheiten unter der Kontrolle deren genomischer, regulatorischer Sequenzen ermöglichen, jedoch sind Transgeninsertionen, welche durch konventionelle Transgeneseverfahren erzeugt wurden, mit diversen Risiken behaftet. Ein häufig auftretendes Problem ist eine hohe Variabilität des Expressionsmusters durch unterschiedliche genomische Insertionspositionen. Gleichzeitig kann nicht in jedem Fall sichergestellt werden kann, dass sämtliche genomische Bereiche für die Expression im Transgen enthalten sind. Zudem kann die Fitness der Population sowohl durch eine hohe genetische Last infolge multipler Transgeninsertionen als auch durch etwaige Sekundärmutationen infolge der Transgenese negativ beeinflusst werden. Der *knockin* einer Epitop-Markierung im nativen genomischen Locus durch homologe Rekombination bietet eine potentielle Möglichkeit derartige nachteilige Effekte zu umgehen. Im Folgenden sollte die CRISPR/Cas-Methode herangezogen werden, um C-terminale EGFP-Fusionen von Condensin-Untereinheiten präzise an deren endogenem Genlocus vorzunehmen.

2.1.1 Validierung und Optimierung eines Screening-Verfahrens für die CRISPR/Cas-basierte Genommodifikation in *D. melanogaster*

Das CRISPR/Cas-System aus *Streptococcus pyogenes* ist ein programmierbares, sequenzspezifisches Manipulationssystem zur gezielten Genomeditierung. Es beruht auf der artifiziellen und ortsspezifischen Induktion von Doppelstrangbrüchen durch die Endonuclease Cas9 und deren anschließender Reparatur durch NHEJ (*Non-homologous end joining*) oder HDR (*Homology directed repair*). Durch die Bereitstellung einer synthetischen Donor-DNA-Matrize kann die Reparatur durch homologe Rekombination begünstigt werden. Die Rekrutierung von Cas9 an den designierten Genlocus erfolgt durch Basenkomplementarität der mit der Endonuclease assoziierten chiRNA. Durch Modifikation der chiRNA-Sequenz kann die Endonuclease Cas9 an nahezu jede gewünschte Stelle in der

Ziel-DNA dirigiert werden (Jinek et al., 2012). Ein absolut notwendiges Kriterium für eine effiziente Bindung und Spaltung durch die Endonuclease Cas9 ist lediglich die Präsenz einer proximalen *PAM-site* (*Protospacer Adjacent Motif*), einem drei Nukleotide umfassenden Sequenzmotiv der Form NGG. Die *PAM-site* ist essentiell für die produktive Bindung von Cas9 an die DNA und stellt somit einen limitierenden Faktor für potentielle Zielsequenzen innerhalb eines Genoms dar. Geeignete Ziel-DNA-Sequenzen, welche ursprünglich als *Protospacerregion* bezeichnet wurden, umfassen insgesamt 20 nt, wobei lediglich die 12 unmittelbar der *PAM-site* angrenzenden Nukleotide, die sogenannte *seed*-Sequenz, für die Bindungsspezifität verantwortlich sind. Durch Co-Injektion eines für die chiRNA kodierenden Plasmids und einer spezifischen HDR-Donor-DNA in Cas9-transgene *Drosophila*-Embryonen können *knockins* der für EGFP kodierenden Sequenz an den endogenen Condensin-Genloci stimuliert werden. Da eine derartige Genomeditierung phänotypisch nicht unmittelbar erkennbar ist, war es erforderlich eine Strategie zu entwickeln, um erfolgreiche HDR-Ereignisse identifizieren zu können. Eine universelle Methode ist die Inkorporation exogener DNA-Sequenzen einschließlich konditionaler, visualisierbarer Marker (Baena-Lopez et al., 2013; Gratz et al., 2014; Xue et al., 2014; Zhang et al., 2014). Zu diesem Zweck wurde in der Arbeitsgruppe ein ähnliches Verfahren entwickelt (Abb. 8) und eine für die homologe Rekombination geeignete Donor-DNA mit integrierter *FRT-3xP3-FRT-EGFP*-Reporterkassette (*F3FE*) konfiguriert (Jordan, 2015). Diese umfasst neben der für EGFP kodierenden Sequenz den vorgeschalteten, augenspezifischen *3xP3*-Promotor, welcher beiderseits von jeweils einer *FRT* (*flippase recognition target*)-site flankiert wird (Abb. 8). Eine essentielle Voraussetzung für die Verwendung einer DNA als Matrize für die HDR ist das Vorhandensein von zu den „blunt“-Enden des DSB homologen Sequenzbereichen. Um dies zu gewährleisten, muss die Reporter-kassette innerhalb der Matrize von homologen, genomischen Sequenzen des betreffenden Gens (*upstream* und *downstream* der Rekombinationsstelle) flankiert werden. Die *3xP3*-abhängige, gewebespezifische Expression von EGFP in den Augen adulter Fliegen erlaubt, nach erfolgreicher Integration der Reporter-kassette in das Fliegengenom, die Selektion positiver HDR-Ereignisse anhand grüner Augenfluoreszenz (Abb. 8). In einem zweiten Injektionsschritt wird durch eine Flp-Rekombinase (Flippase)-katalysierte Excision ein Teil der Reporter-kassette (*FRT*-(*SV40*)-*3xP3*) wieder entfernt, wodurch die Transkriptionseinheiten des jeweiligen Gens und *EGFP* fusioniert und ein durchgehender Leserahmen zwischen Gen und *EGFP* erzeugt wird (Abb. 8).

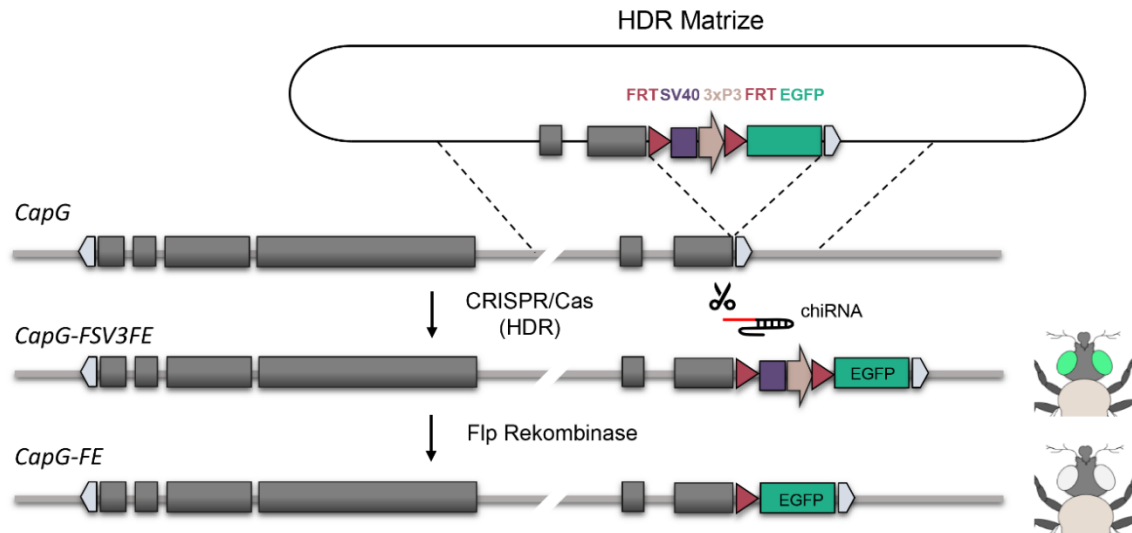


Abbildung 8 | Strategie des CRISPR/Cas-vermittelten *EGFP knockins* am Beispiel des *CapG*-Genlocus. Die chiRNA vermittelt sequenzspezifisch die Cas9-abhängige Induktion eines DSB innerhalb des sechsten Exons von *CapG* upstream des Stopcodons. Die Plasmid-basierte HDR-Matrize enthält die *EGFP*-Reporterkassette bestehend aus der für *EGFP* kodierenden Sequenz (grün), der optionalen *SV40*-Terminatorsequenz (violett) und der *3xP3*-Promotorregion (braun) sowie zwei palindromischen *FRT*-sites (rot) in gleicher Orientierung. Flankiert wird die *F(SV)3FE*-Kassette beiderseits von zu *CapG* homologen Sequenzbereichen (gestrichelte Linien), welche die Grundlage für die homologe Rekombination bilden. Die Reparatur des artifiziellen DSB über HDR führt zur Integration der Reporterkassette an der designierten Position im nativen Genlocus von *CapG*. Die optionale *SV40*-Terminatorsequenz vermittelt die Transkriptionstermination und effiziente Initiation der augenspezifischen *EGFP*-Expression durch den downstream gelegenen *3xP3*-Promotor. Durch die Flp-Rekombinase induzierte Excision der von *FRT*-sites flankierten Sequenz *FRT*-(*SV40*)-*3xP3* wird ein durchgehender Leserahmen zwischen dem C-Terminus von *CapG* und *EGFP* generiert, welche über eine kurze Linkerregion in Form einer *FRT*-site fusioniert sind.

Unter Verwendung dieser Strategie konnte in der Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Arbeit ein *knockin* von *EGFP* im endogenen Genlocus von *CapG* erzeugt werden (Jordan, 2015). Als problematisch erwies sich dabei jedoch ein schwaches Fluoreszenzsignal von *EGFP*, insbesondere im heterozygoten Zustand der F1-Individuen, welches die präzise Selektion positiver Rekombinationsereignisse deutlich erschwerte. Eine potentielle Ursache für die geringe Fluoreszenzintensität ist die unmittelbare Nähe der Transkriptionseinheit *3xP3-FRT-EGFP* 3' der Transkriptionseinheit von *CapG*. Durch die direkte Angrenzung von *3xP3-FRT-EGFP* an den *CapG*-Genlocus wird die Transkription ausgehend von den *CapG*-regulatorischen Sequenzen nicht terminiert und unterbindet so mutmaßlich eine effiziente Transkriptionsinitiation und -regulation von *EGFP* durch den *3xP3* Promotor.

Auf Grundlage dieser Annahme sollte der Versuch unternommen werden, die Methode dahingehend zu optimieren, eine verbesserte *EGFP*-Expression zu erzielen. Zu diesem Zweck

sollte die *F3FE*-Reporterkassette durch Einfügen der Poly-A-Terminatorsequenz des Simian Virus 40 (*SV40*) *upstream* des *3xP3*-Promotors modifiziert werden (Abb. 8). Durch Insertion der *SV40*-Sequenz sollten beide Transkriptionseinheiten funktionell voneinander getrennt werden. Auf diese Weise wird die von den *CapG*-regulatorischen Sequenzen ausgehende Transkription effektiv terminiert und die Transkriptionsinitiation der für EGFP kodierenden Sequenz ausgehend von *3xP3* mutmaßlich erhöht. Nach Co-Injektion der Plasmide pSICapG^c-noPAM-FSV3FE (HDR-Donor-DNA) und pU6-chiRNA-G-E6 (chiRNA) in syncytiale *nos-Cas9*-Embryonen wurden die sich entwickelnden Mosaik-Männchen mit jungfräulichen Weibchen des Genotyps *w*^{*}; *Sco/CyO*, *P[ry⁺, ftz lacZ]* ausgekreuzt. In der F1-Generation wurden in 25 % der Kreuzungsansätze Individuen mit grün-fluoreszierenden Augen identifiziert. Tatsächlich konnte durch die Integration der *SV40*-Terminatorsequenz eine erhebliche Steigerung der EGFP-Expression erzielt werden. Ein direkter Vergleich der Augenfluoreszenz unter den F1-Individuen zeigt eine um ein Vielfaches höhere Fluoreszenzintensität nach Integration des *SV40*-Terminators (Abb. 9 A). Quantitative Analysen im Western Blot deuten auf ein mehr als neunfach höheres Expressionslevel von EGFP nach Integration von *SV40* hin (Abb. 9 B).

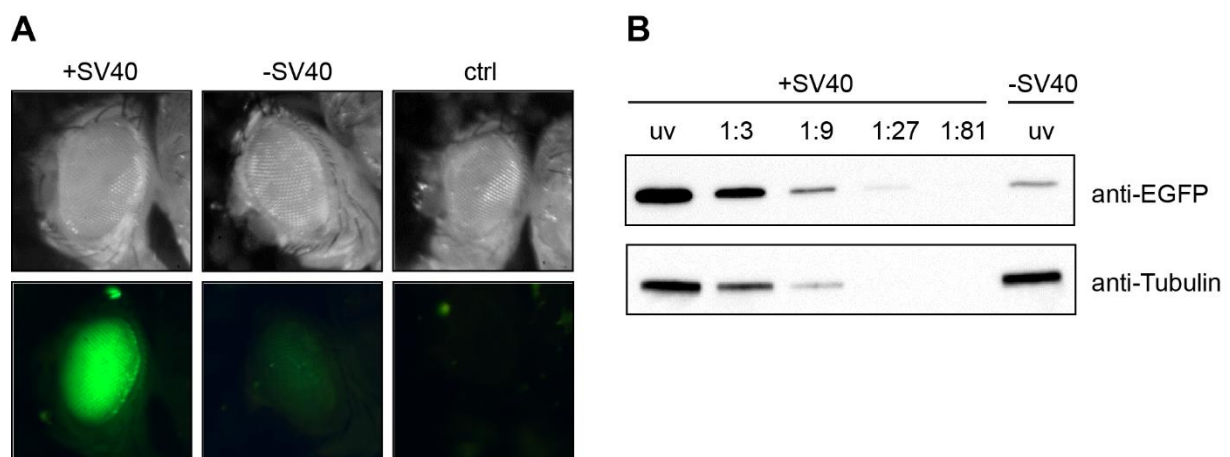


Abbildung 9 | Die Integration der *SV40*-Terminatorsequenz hat eine erhöhte *3xP3*-abhängige Expression von EGFP zur Folge. Durch die Integration der *SV40*-Terminatorsequenz in die *EGFP*-Reporterkassette *upstream* des *3xP3*-Promotors kann die augenspezifische Expression von EGFP signifikant gesteigert werden. A) Direkter Vergleich der Augenfluoreszenz nach CRISPR/Cas-vermittelter Integration der *EGFP*-Reporterkassette in den Genlocus von *CapG* mit und ohne *SV40*-Terminatorsequenz bei gleicher Belichtungsdauer. *w*-Fliegen ohne spezifische Augenfluoreszenz wurden als Negativkontrolle dokumentiert (ctrl). B) Western Blot zur Abschätzung der EGFP-Expressionslevel. Es wurden Proteinextrakte aus jeweils zehn Kopfsegmenten von Fliegen der Genotypen *w*^{*}; *CapG-F3FE/CyO*, *P[ry⁺, ftz lacZ]* (-SV40) und *w*^{*}; *CapG-FSV3FE/CyO*, *P[ry⁺, ftz lacZ]* (+SV40) erzeugt. Die Proteinextrakte wurden unverdünnt (uv) oder in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:3, 1:9, 1:27 oder 1:81) geladen. Die Sondierung erfolgte mit gegen EGFP und α -Tubulin gerichteten Antikörpern.

Durch Integration der *SV40*-Terminatorsequenz konnte die zuvor etablierte Methode somit optimiert werden, um Locus-spezifische *knockins* zu generieren und positive Rekombinations-ereignisse effizient und verlässlich zu selektionieren. In weiterführenden Experimenten sollte das System schließlich verwendet werden, um derartige Modifikationen an anderen Genloci als den für *CapG* vorzunehmen.

2.1.2 CRISPR/Cas-vermittelter *EGFP-knockin* im endogenen *Barren* Locus

Um eine stabile Fliegenlinie zu generieren, welche die Expression einer C-terminalen EGFP-Fusion der Condensin-Untereinheit Barren ausgehend von deren endogenem Promotor ermöglicht, mussten zunächst eine geeignete chiRNA sowie ein geeigneter HDR-Donor-Vektor (pSI-Barren^C-noPAM-FSV3FE) konzipiert werden. Um eine kontrollierte Genomeditierung ortsspezifisch an dem definierten Locus (C-terminales Ende von *Barren*) zu garantieren, muss die verwendete chiRNA einige wichtige Kriterien erfüllen. Für eine effiziente Rekombination sollte der artifiziell induzierte DSB eine maximale Entfernung von 40 bp zur designierten Rekombinationsstelle nicht überschreiten (Henley et al., 2014). Die chiRNA wurde daher so konzipiert, dass diese eine *Protospacer*-Region innerhalb des dritten Exons von *Barren* erkennt und den DSB gezielt 35 nt *upstream* des Stopcodons vermittelt. Darüber hinaus sollte die chiRNA möglichst keine oder wenige *off-target*-Sequenzen innerhalb des *Drosophila*-Genoms aufweisen, da andernfalls ein erhöhtes Risiko für die Entstehung etwaiger Sekundärmutationen in Folge Cas9-abhängiger Doppelstrangbrüche besteht. Um das Risiko potentieller *off-target*-Sequenzen zu minimieren, wurde die Sequenz der verwendeten chiRNA (B-E3) mit der Sequenz des gesamten Fliegen-genoms unter maximaler Stringenz in der online verfügbaren Software *flyCRISPR target finder* abgeglichen. Potentielle *off-target*-Sequenzen wurden nach Position und Anzahl von Fehlpaarungen innerhalb der *seed*-Sequenz sowie nach der Basensequenz der *PAM-site* ermittelt. Für die konfigurierte chiRNA B-E3 (5'-GCTAATTCCGCAGGAGGACTTGG-3') wurden keine riskanten *off-target*-Sequenzen innerhalb des Fliegen-genoms identifiziert. Als weiteres Kriterium für eine effiziente Rekombination gilt die Länge der Homologiebereiche innerhalb der Donor-DNA. Homologe Sequenzen ab einer Länge von 1 kb erwiesen sich als optimal für die Effizienz der HDR (Beumer et al., 2013). Als Homologiearme wurden eine 1182 bp lange Sequenz *upstream* und eine 1160 bp lange Sequenz *downstream* der Rekombinationsstelle

gewählt. Um die Rekombinationseffizienz überdies zu erhöhen, wurde die *seed*-Sequenz in der Donor-DNA unter Beibehaltung des genetischen Codes mutiert. Die Mutation von *seed*-Sequenz bzw. *PAM-site* unterbindet die Cas9-abhängige Hydrolyse der HDR-Matrize und verhindert deren frühzeitigen Abbau. Unter diesen Parametern wird im Rahmen der HDR das Stopcodon von *Barren* gegen die *FSV3FE*-Reporter-kassette ausgetauscht ohne den genomischen Locus zusätzlich zu manipulieren.

Nach Co-Injektion von Donor-DNA (pSI-*Barren*^C-noPAM-*FSV3FE*) und chiRNA in syncytiale *nos-Cas9*-Embryonen wurden einzelne männliche Mosaik-Fliegen (G0) mit Jungfrauen des Genotyps *w**; *Sco/CyO*, *P[ry+, ftz lacZ]* gekreuzt. Um die Effizienz der Keimbahntransmission abschätzen zu können, wurden sämtliche F1-Individuen auf grüne Augenfluoreszenz hin untersucht. In 11 von 39 Kreuzungsansätzen der G0-Männchen konnten positive Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden. Dies entspricht einer CRISPR-induzierten Rekombinationsfrequenz von 28 % (Abb. 10 A). Über analytische PCR ausgehend von genomischer DNA aus heterozygoten F1-Individuen (*w**; *Barren-FSV3FE/CyO*, *P[ry+, ftz lacZ]*) wurde die Integrität der CRISPR/Cas-vermittelten Mutagenese überprüft. Die geeignete Wahl der für die PCR verwendeten Oligonukleotide (ein Oligonukleotid hybridisiert im zweiten Exon von *Barren* außerhalb des Homologiebereichs (KS11), das zweite in der 3'-untranslatierten Region (KS102)) erlaubt eine Aussage darüber, ob die Integration der Reporter-kassette tatsächlich an der definierten Position im *Barren* Locus stattgefunden hat. Die ortsspezifische Integration wird durch das Auftreten eines hochmolekularen PCR-Produkts nachgewiesen, welches im Fall der G0-Fliegen (*y*¹, *w***M[nos-cas9, w+]**ZH-2A*) fehlt (Abb. 10 C). Für das Allel *Barren-FSV3FE* wird ein charakteristisches Amplifikat der Größe 2940 bp erwartet, während das Produkt des wildtypischen Allels nur 1628 bp beträgt. Ein charakteristisches Produkt nach Amplifikation mit KS11 und KS 102, gleichbedeutend mit einer Integration im *Barren*-Locus, konnte in allen untersuchten Linien detektiert werden. Folglich ist davon auszugehen, dass alle Linien die gewünschte Integration von *FSV3FE* im *Barren*-Locus enthalten. Eine dieser Linien (Linie Nr.5) wurde im Folgenden herangezogen, um die Sequenzen von *SV40* und *3xP3* rekombinationsabhängig zu entfernen und dabei die kodierenden Bereiche für *Barren* und EGFP zu einem durchgehenden Leserahmen zu fusionieren.

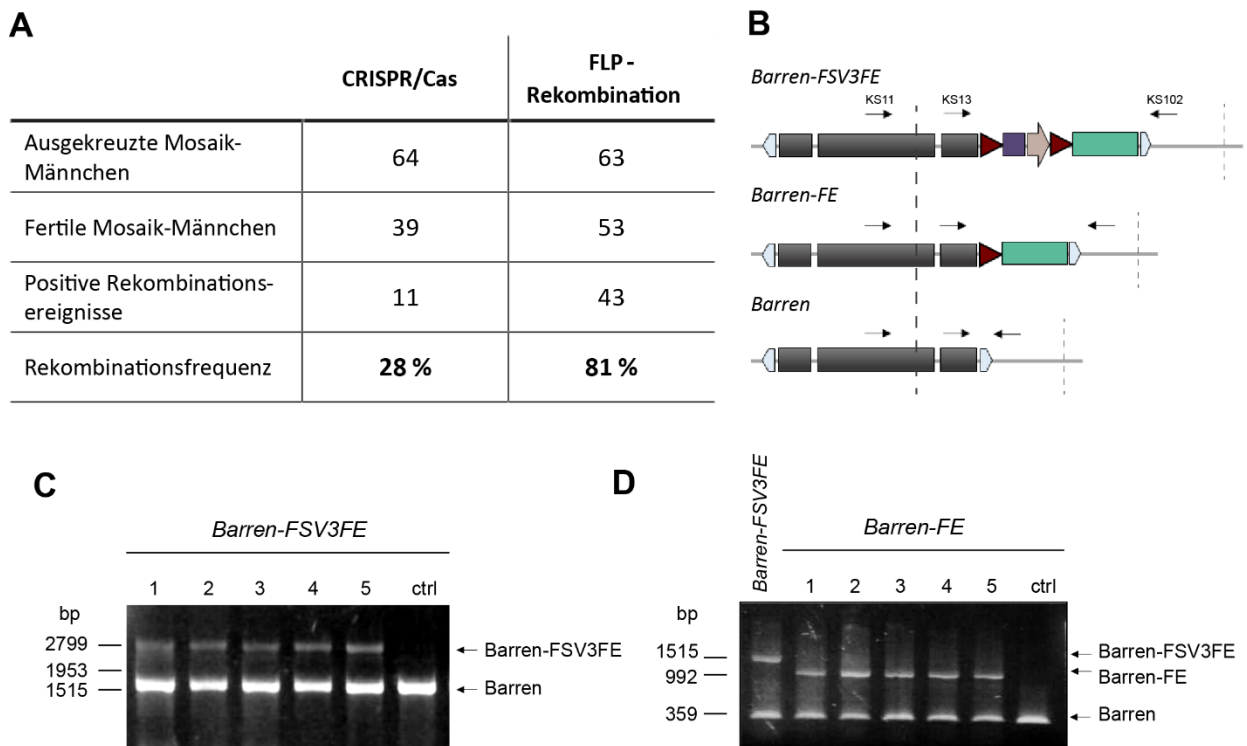


Abbildung 10 | Molekulare Charakterisierung der Allele *Barren-FSV3FE* und *Barren-FE*. A) Rekombinationsraten nach Co-Injektion von chiRNA (pU6-chiRNA-B-E3) und HR-Donor-DNA (pSI-*Barren^C*-noPAM-FSV3FE) sowie nach Injektion von Flp-mRNA in syncytiale *D. melanogaster*-Embryonen. Angegeben ist die Gesamtzahl aller angesetzten und davon fertilen Kreuzungen ausgehend von einzelnen Mosaik-Männchen (G0). Der Anteil von positiven Rekombinationsereignissen an der Gesamtzahl fertiler Rekombinationskreuzungen ergibt Rekombinationsfrequenzen von 28 % bzw. 81 %. Positive Rekombinationsereignisse sind definiert als Kreuzungsansätze mit mindestens einem Individuum mit fluoreszierenden Augen (CRISPR/Cas) bzw. nicht fluoreszierenden Augen (FLP-Rekombination) B) Schematischer Überblick über den Genlocus von *Barren*. Gezeigt ist die Exon-Struktur des endogenen *Barren* Locus (unten) sowie nach Integration der *FSV3FE*-Reporterkassette (oben) und anschließender Entfernung von *SV40* und *3xP3* (Mitte). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Ende der Homologiebereiche. C) Molekulare Kartierung der CRISPR/Cas-vermittelten Mutagenese durch PCR auf Basis genomischer DNA von F1-Individuen aus fünf unabhängigen Linien. Die PCR mit den Primern KS11 und KS102 erlaubt die spezifische Amplifikation eines genomischen DNA Sequenzbereiches innerhalb des Genlocus von *Barren*. Die Integration der Reporterkassette *FSV3FE* führt zum Auftreten eines höhermolekularen PCR-Produkts zusätzlich dem Produkt der endogenen Sequenz. D) Molekularer Nachweis der Flp-abhängigen Excision der *FRT-SV40-3xP3*-Sequenz durch PCR mit dem Primerpaar KS13 und KS102 ausgehend von fünf unabhängigen Linien. Je nach zugrundeliegender DNA-Sequenz (vor bzw. nach Excision) werden unterschiedliche Größen der Amplifikate erwartet. Als Kontrolle (ctrl) wurde genomische DNA aus nos-Cas9 Fliegen verwendet.

Die Excision des Sequenzabschnitts *FRT-SV40-3xP3* erfolgte durch Injektion von *in vitro* synthetisierter Flp kodierender mRNA in syncytiale Embryonen des Genotyps *w^{*}; Barren-FSV3FE/CyO, P[ry⁺, ftz lacZ]*. Einzelne Mosaik-Männchen wurden gegen *CyO* selektioniert und

mit w^* ; *Sco/CyO*, *P[ry⁺,ftz lacZ]* Jungfrauen gekreuzt, um das modifizierte Allel *Barren-FE* zu isolieren und an die F1-Nachkommen zu vererben, wo es ubiquitär in allen Zellen präsent sein sollte. Positive Rekombinationsereignisse lassen sich in diesem Fall durch den Verlust der grünen Augenfluoreszenz identifizieren. In 43 von 53 fertilen Kreuzungsansätzen wurden Nachkommen ohne grün fluoreszierende Augen hervorgebracht. Dies entspricht einer Rekombinationsrate von 81 % (Abb. 10 A). Darüber hinaus kann die erfolgreiche Excision der Reportersequenz durch einen *downshift* des amplifizierten PCR-Produkts nachgewiesen werden. Durch die Flippase-vermittelte Reaktion wird ein 489 bp umfassender Sequenzabschnitt (*FRT-SV40-3xP3*) rekombinatorisch deletiert. Nach erfolgreichem *flipout* wird folglich ein um 489 bp verkürztes Amplifikat gebildet, welches sich durch ein schnelleres Laufverhalten bei gelelektrophoretischer Auftrennung auszeichnet (Abb. 10 D).

Für eine genaue Charakterisierung wurden die etablierten Fliegenlinien (w^* ; *Barren-FE/CyO*, *P[ry⁺,ftz lacZ]*) durch Western Blot-Analysen zunächst auf die Expression und schließlich auf Funktionalität von Barren-FE hin getestet (Abb. 11).

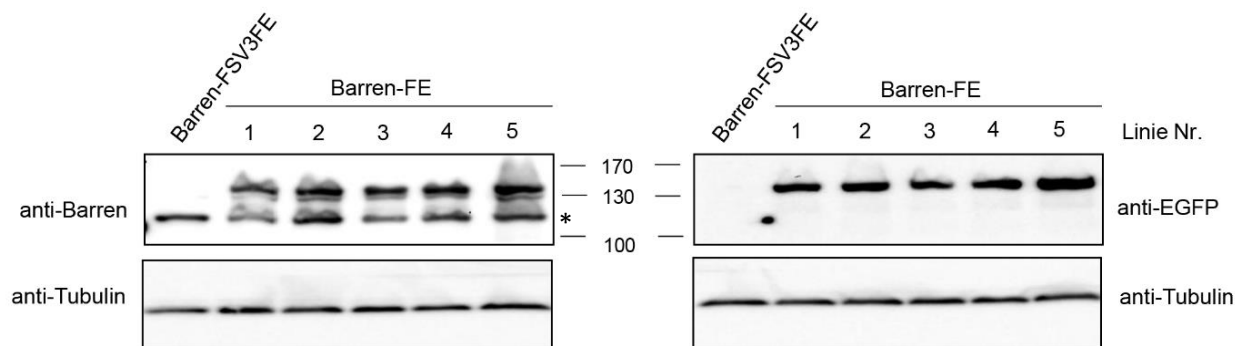


Abbildung 11 | Barren-FE wird in der Keimbahn von *D. melanogaster* exprimiert. Immunologischer Nachweis der Expression von Barren-FE in meiotischem Gewebe von *D. melanogaster*. Geladen sind Proteinextrakte aus jeweils zwei Ovarien von heterozygoten Individuen der Genotypen w^* ; *Barren-FE/CyO*, *P[ry⁺,ftz lacZ]* bzw. w^* ; *Barren-FSV3FE/CyO*, *P[ry⁺,ftz lacZ]*. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Barren- und EGFP- sowie α -Tubulin-spezifische Antikörper als Ladekontrolle. Durch Sondierung mit dem Barren-spezifischen Antikörpern wird neben der Bande für Barren-FE auch endogenes Barren (*) detektiert.

Da das Fusionsprotein Barren-FE in nachfolgenden Experimenten für Lokalisations- sowie Funktionsanalysen von Condensin in der Meiose verwendet werden soll, wurde die Expression in der Keimbahn analysiert. In den fünf untersuchten Linien konnte eine stabile

und effiziente Expression von Barren-FE nachgewiesen werden (Abb. 11). Neben dem spezifischen Signal für endogenes Barren kann in allen Fällen eine zweite, höhermolekulare Bande detektiert werden. Die Sondierung mit gegen EGFP gerichteten Antikörpern belegt, dass es sich dabei um die modifizierte Version Barren-FE handelt. Der unmittelbare Vergleich der Bandenintensitäten von Barren-FE mit denen von endogenem Barren deutet vergleichbare Expressionslevel beider Varianten an. Dies ist bei einer präzisen Insertion am genomischen Locus auch erwartet.

Schließlich war es problemlos möglich die erzeugten Barren-FE-Allele in homozygotem Zustand stabil zu etablieren. Die entsprechenden Fliegen sind dadurch gekennzeichnet, dass diesen als einzige verfügbare Quelle für die Condensin-Untereinheit Barren die C-terminal mit EGFP fusionierte Variante zur Verfügung steht. Für Barren-FE homozygote Fliegen sind voll lebensfähig und weisen keine reduzierte Fitness auf. In mitotisch proliferierendem Gewebe von *D. melanogaster*-Embryonen konnte zudem ein für Barren typisches Lokalisationsmuster am mitotischen Chromatin von Prophase bis zum Ende der Anaphase nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abb. 36). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass das mittels CRISPR/Cas erzeugte Fusionsprotein *Barren-FE* physiologisch voll funktionell ist und sich in weiterführenden Experimenten zur Funktionsanalyse von Barren eignet.

2.2 Lokalisation und Dynamik des Condensin I-Komplexes in der männlichen Meiose von *D. melanogaster*

2.2.1 Condensin I-Untereinheiten lokalisieren am meiotischen Chromatin

Während für Condensin II eine essentielle Rolle in der männlichen Meiose von *D. melanogaster* sehr wahrscheinlich ist (Hartl et al., 2008b), existieren bislang keine publizierten Daten, die auf eine Funktion des Condensin I-Komplexes in der männlichen Keimbahn hinweisen. Um potentielle Funktionen von Condensin I während der männlichen Keimzellbildung in *D. melanogaster* zu identifizieren, sollte zunächst die Lokalisation der Condensin I-spezifischen Untereinheiten im Verlauf der Meiose untersucht werden. Über qualitative Fluoreszenzanalysen sollte die Assoziation des Condensin-Komplexes mit dem meiotischen Chromatin evaluiert werden. Durch *in vivo* Mikroskopie an kultivierten Spermatozyten kann die meiotische Progression unter physiologischen Bedingungen in Echtzeit verfolgt werden. Um das räumlich-zeitliche Lokalisationsverhalten des Chromatins

sowie einzelner Condensin-Untereinheiten simultan beobachten zu können, wurden Fliegenlinien generiert, die neben EGFP-markierten Untereinheiten des Condensin-Komplexes eine rot fluoreszierende Variante des Histons 2Av (His2Av-mRFP) exprimieren. Die Expression von EGFP-fusionierten Varianten der Untereinheiten SMC2, CapD2, Barren und CapG erfolgt in allen Fällen unter Kontrolle deren genomischer cis-regulatorischer Sequenzen, wodurch die Vergleichbarkeit mit den korrespondierenden, wildtypischen Proteinen gewährleistet wird. Die Proteine CapD2 und SMC2 wurden an ihrem N-Terminus (EGFP-CapD2) bzw. innerhalb der zentralen *hinge*-Region (SMC2_h-EGFP) mit EGFP fusioniert und werden von einer transgenen Quelle außerhalb des endogenen Genlocus exprimiert (Herzog et al., 2013). Beide Transgene kodieren für funktionelle Genprodukte, da diese die Letalität, welche mit *loss-of-function* Mutationen der jeweiligen Gene assoziiert ist, komplementieren. Die Allele für CapG-FE und Barren-FE kodieren für C-terminal mit EGFP markierte Fusionsproteine und wurden durch CRISPR/Cas9-basierte Modifikation des endogenen Locus erzeugt. Für die *in vivo* Mikroskopie wurden Zysten identifiziert, die sich in der späten Prophase der ersten meiotischen Teilung befinden. Die Identifizierung derartiger Zysten geschieht dabei anhand der für dieses Stadium der Meiose charakteristischen Chromatinterritorien der chromosomalen Bivalente. Zu Beginn der ersten meiotischen Teilung sind alle untersuchten Condensin I-Untereinheiten vornehmlich cytoplasmatisch angereichert (Abb. 12). Erst nach NEBD (*nuclear envelope breakdown*) wird das Chromatin für die Condensin-Proteine zugänglich. Nach NEBD kann eine Kollokalisierung der Signale für His2Av-mRFP und Condensin-EGFP beobachtet werden, welche über den gesamten Verlauf von Metaphase persistiert (Abb. 12). Der Zeitpunkt des NEBD kann durch die plötzlich eintretende Dispersion von nukleär angereichertem, rot-fluoreszierendem His2Av-mRFP identifiziert werden, das nicht Chromatin-gebunden vorliegt. Auffällig dabei ist, dass die Condensin I-Untereinheiten erst nach Initiation der Chromosomenkondensation (ICC) mit dem Chromatin zu assoziieren scheinen. Die Condensin I-Untereinheiten können erst dann eindeutig am Chromatin nachgewiesen werden, wenn die gepaarten Chromosomen beginnen in die Äquatorialebene zu wandern, obwohl diese zu diesem Zeitpunkt bereits weitgehend kondensiert sind (siehe z. B. Barren und CapD2 Prometaphase).

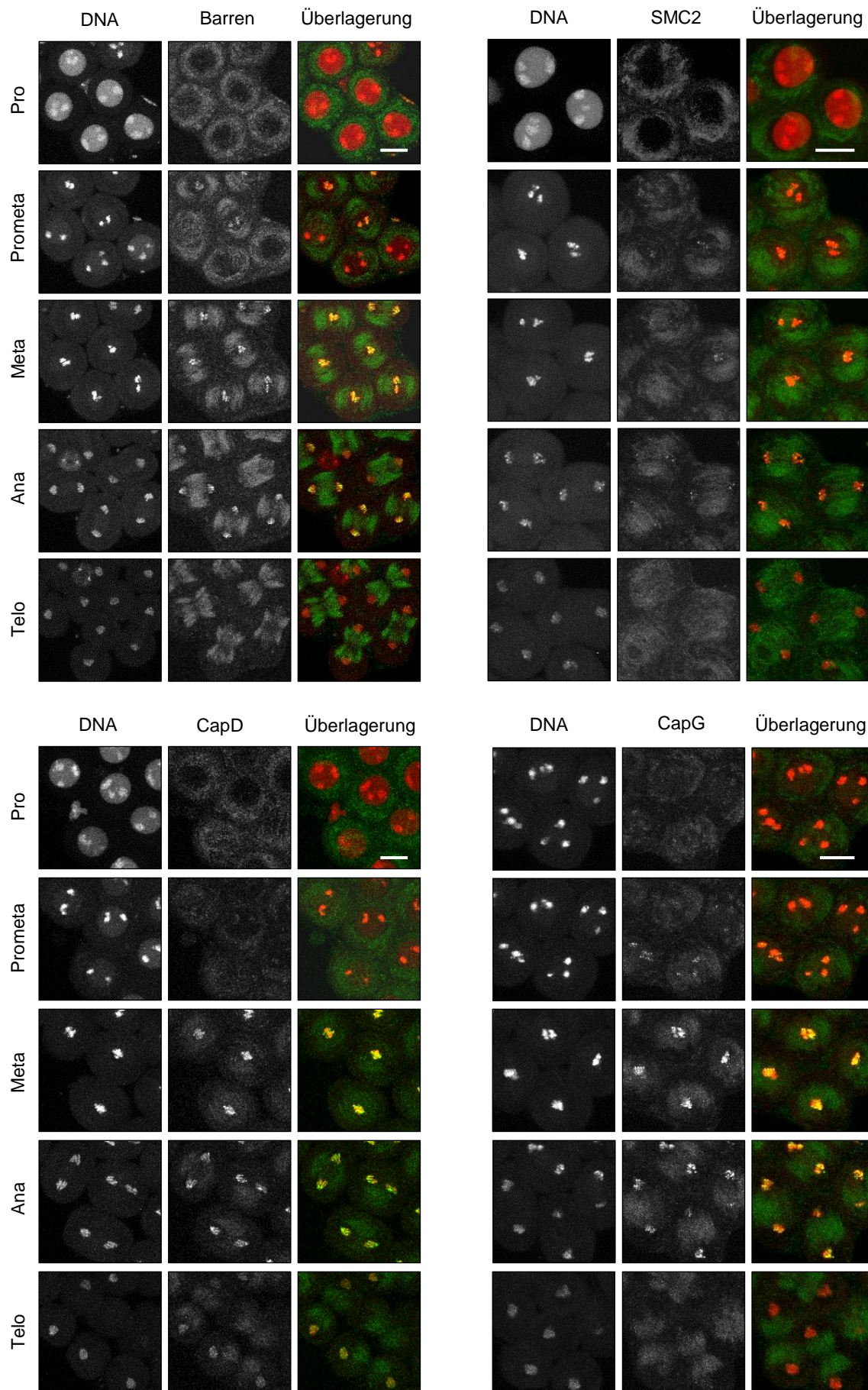


Abbildung 12

Diese Beobachtung ist konsistent mit der Annahme, dass der Condensin I-Komplex erst in einer späten Phase der Chromosomenkompaktierung involviert ist, während Condensin II die initialen Schritte der Kondensation vermittelt (Green et al., 2012; Shintomi and Hirano, 2011).

Alle Condensin I-Untereinheiten dissoziieren vom Chromatin in später Anaphase/früher Telophase (Abb. 12). Das cytoplasmatisch erscheinende Fluoreszenzsignal, welches in allen Meiose I-Stadien detektierbar ist, entspricht sehr wahrscheinlich einem unspezifischen Hintergrundsignal, da dieses auch in Spermatozyten wildtypischer w^+ -Individuen auftritt (Daten nicht gezeigt). Obwohl SMC2, anders als CapG, Barren und CapD2, sowohl in Condensin I- als auch Condensin II-Komplexen präsent sein sollte, weist SMC2_h-EGFP ein vergleichsweise schwaches Fluoreszenzsignal am Chromatin auf. Eine denkbare Ursache dafür ist, dass SMC2_h-EGFP mit dem endogenen SMC2-Protein um diverse Proteinbindestellen kompetitiert. Da die Expression von SMC2_h-EGFP und EGFP-CapD2, bedingt durch die ϕ C31-Integrase-vermittelte Integration, ausgehend von Transgenen im Hintergrund des jeweiligen endogenen Proteins erfolgt, kann ein geringfügig vermindertes Potential von SMC2_h-EGFP Condensin-Holokomplexe zu assemblieren, dazu führen, dass das endogene Protein die Bindestellen im Komplex absättigt.

Ein äquivalentes Lokalisationsverhalten der Condensin I-Untereinheiten kann auch in Meiose II beobachtet werden (Anhang, Abb. 37). Die Chromatinassoziation von Condensin I während beider meiotischer Teilungen liefert somit erste Anhaltspunkte für eine Rolle dieses Komplexes bei der Organisation des meiotischen Chromatins während der männlichen Keimzellbildung von *D. melanogaster*. Die augenscheinlich sehr spät eintretende Lokalisation der Condensin I-Untereinheiten am Chromatin erst nach NEBD und ICC deutet jedoch darauf hin, dass Condensin I für die initialen Schritte der Chromosomenkompaktierung entbehrlich ist.

Abbildung 12 | Condensin I-Untereinheiten lokalisieren am meiotischen Chromatin im Verlauf von Meiose I. *In vivo* Mikroskopie von kultivierten, primären Spermatozyten, die neben den EGFP-markierten Condensin-Untereinheiten SMC2_h-EGFP (oben rechts), EGFP-CapD2 (unten links), Barren-FE (oben links) und CapG-FE (unten rechts) rot-fluoreszierendes Histon 2Av (His2Av-mRFP) exprimieren. Es sind repräsentative Aufnahmen aller Meiose I-Stadien gezeigt. Zysten wurden aus den Hoden früher Pupalstadien isoliert und kultiviert. In Prophase I befindliche Zystenstadien wurden anhand von Kernmorphologie und Anwesenheit von Chromatinterritorien identifiziert und mikroskopiert. Die Aufnahme einzelner Bilder erfolgte in zeitlichen Intervallen von jeweils 3 min. Maßstab: 10 μ m

2.2.2 Der meiotischen Chromatinassoziation von Condensin I liegen dynamische Wechselwirkungen zugrunde

Unabhängige Studien aus verschiedenen Modellorganismen belegen, dass es sich bei der Chromatinassoziation des Condensin I-Komplexes in Mitose um eine dynamische Interaktion handelt. Chromatin-gebundene Condensin I-Komplexe unterliegen in Prometa- und Metaphase einem kontinuierlichen Austausch mit der cytosolischen Proteinfraction (Gerlich et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Um die dynamischen Eigenschaften von Condensin I auch in Meiose zu charakterisieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vivo* FRAP-Analysen an primären Spermatozyten durchgeführt (Abb. 13). *Drosophila*-Spermatozyten stellen aufgrund der Synchronität der meiotischen Teilungen ein ideales System für die Durchführbarkeit von FRAP-Analysen dar. Ein zum untersuchten Spermatozytenkern benachbarter Kern kann unmittelbar als Referenz für das Bleichen und die nachfolgende Fluoreszenzregeneration herangezogen werden.

Um eine Aussage über die Stabilität der Chromatinassoziation von Condensin I treffen zu können, wurde das Fluoreszenzsignal der EGFP-fusionierten Condensin I-Untereinheiten CapD2 und Barren durch einen kurzen Laserimpuls gebleicht und die Regeneration des Signals über die Metaphase hinweg verfolgt. Die ROI (*region of interest*) wurde dabei so gewählt, dass die Metaphaseplatte in ihrer gesamten Dimension durch den Bleichimpuls erfasst wird. Die Auswahl der ROI nach diesem Kriterium kompensiert Veränderungen der Assoziation des jeweiligen Proteins mit der DNA durch chromosomale Umlagerungen und stellt somit sicher, dass eine etwaige beobachtete Fluoreszenzregeneration ausschließlich die Inkorporation neuer Fluoreszenzmoleküle des cytoplasmatischen Proteinpools reflektiert. Der Bleichimpuls wurde genau dann ausgelöst, wenn alle Chromosomen vollständig in der Metaphaseplatte assembliert waren. Unter der Annahme, dass zu diesem Zeitpunkt ein Sättigungs- und Gleichgewichtszustand erreicht ist und kein zusätzliches Condensin mehr an das Chromatin rekrutiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass als Änderung der Fluoreszenzintensität lediglich der dynamische Austausch und nicht das initiale Laden von Condensin an das kondensierende Chromatin erfasst wird. In Mitose konnte zuvor gezeigt werden, dass die Chromatinassoziation der Condensin I-Untereinheiten (mit Ausnahme von CapG) in Metaphase ihr maximales Level erreicht (Herzog et al., 2013).

Unter den gewählten Bedingungen kann eine Reduktion des EGFP-Signals bis auf maximal 40 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität erzielt werden (Abb. 13).

Ausgehend davon wurde die RFI (relative Fluoreszenzintensität) bis zum Eintritt in die Anaphase verfolgt

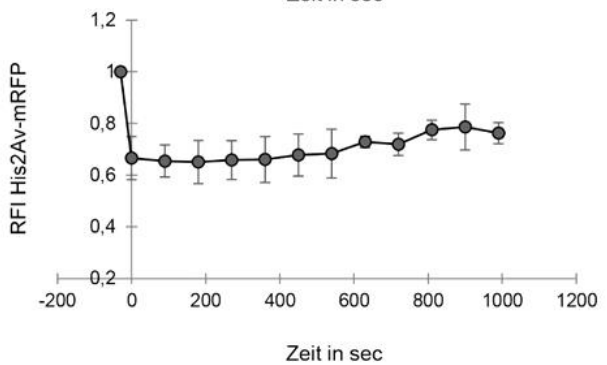
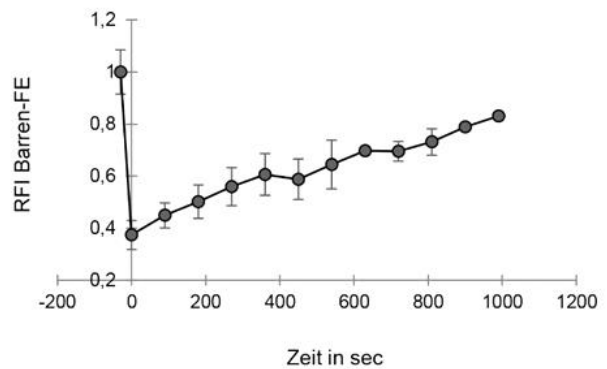
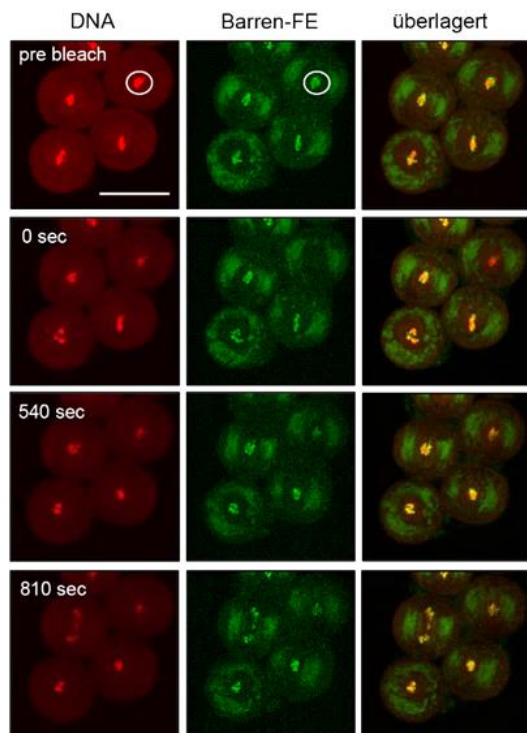
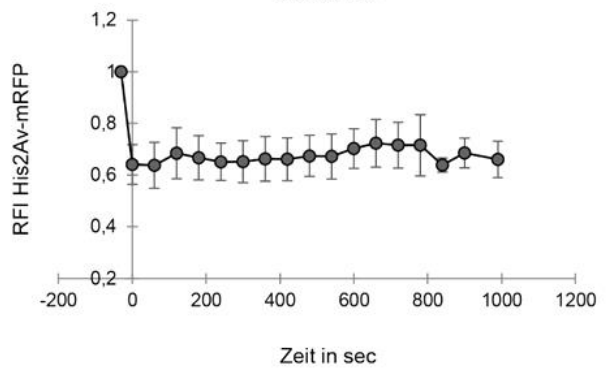
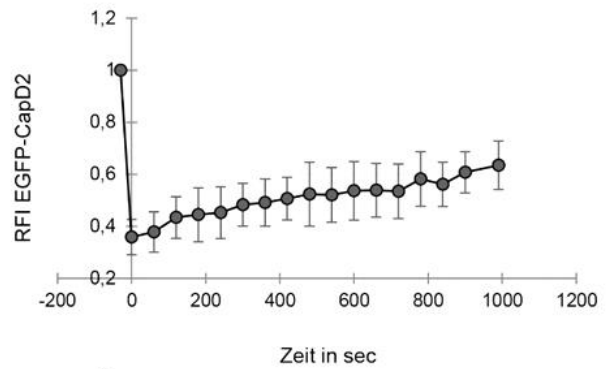
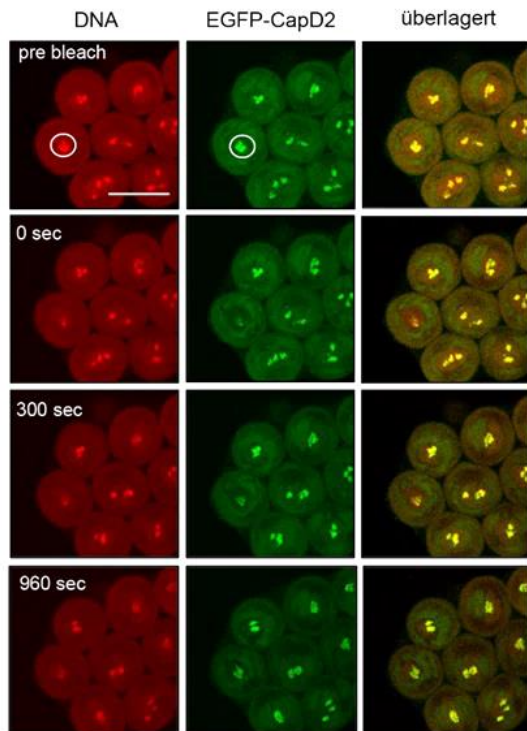


Abbildung 13

Die RFI entspricht dabei dem Verhältnis aus der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des gebleichten Metaphasechromatins und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des ungebleichten Metaphasechromatins eines benachbarten Kontrollkerns. Als Negativkontrolle wurde das dynamische Verhalten von His2Av-mRFP visualisiert. Erwartungsgemäß lässt sich für diesen Fall kein Wiederanstieg der Fluoreszenzintensität nach dem Photobleichen messen (Abb. 13). Im Fall der untersuchten Condensin-Untereinheiten CapD2 und Barren hingegen kann eine signifikante Zunahme der RFI beobachtet werden (Abb. 13). Es wurde eine Regeneration des Fluoreszenzsignals bis auf ca. 83 % (Barren-FE) bzw. 63 % (EGFP-CapD2) der anfänglichen Fluoreszenzintensität gemessen. Dies lässt den Schluss zu, dass nach dem Bleichen eine Neurekrutierung von Condensin I an das kondensierte Chromatin stattfindet. Aufgrund der Tatsache, dass trotz der Neurekrutierung die initiale Fluoreszenzintensität von 100 % nicht erreicht wird, muss davon ausgegangen werden, dass lediglich eine Subfraktion der Chromatin-gebundenen Condensin-Komplexe dynamisch ist, während eine zweite Fraktion stabil mit dem Chromatin assoziiert. Um quantitative Aussagen über die Bindungskinetik und den Anteil der mobilen Fraktion treffen zu können, wurden die Messwerte in eine Drei-Parameter-Einfach-Exponentialfunktion umgewandelt (Oliveira et al., 2007). Die durchgeführte Regressionsanalyse verdeutlicht, dass die Mehrheit der Chromatin-gebundenen EGFP-CapD2 Moleküle (59 %) dynamisch mit der DNA assoziiert und mit einer Halbwertszeit von 693 sec ausgetauscht wird. Dahingegen macht die mobile Fraktion von Barren-FE lediglich ein Viertel (25 %) der gesamten am Chromatin gebundenen Proteinfraktion aus. Die Halbwertszeit beträgt in diesem Fall 990 sec. Die FRAP-Analysen mit einzelnen Condensin-Untereinheiten implizieren, dass auch der meiotischen Chromatinassoziation von Condensin I dynamische Interaktionen zugrunde liegen und sich Chromatin-gebundene Condensin I-Komplexe im Austausch mit der cytosolischen Proteinfraktion befinden.

Abbildung 13 | Die Chromatinassoziation der Condensin I-Untereinheiten Barren und CapD2 in Meiose I ist dynamisch. FRAP-Analysen an kultivierten, primären Spermatozyten, die neben EGFP-markierten Condensin I-Untereinheiten (Barren-FE und EGFP-CapD2) rot-fluoreszierendes Histon 2Av (His2Av-mRFP) exprimieren. Die ROI (weißer Kreis) wurde definiert und die Metaphaseplatte durch einen Laserimpuls gebleicht. Es sind repräsentative Aufnahmen eines FRAP-Experiments vor dem Bleichen (*pre bleach*) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Bleichen gezeigt. Die Aufnahme einzelner Bilder erfolgte in zeitlichen Intervallen von 30 sec (EGFP-CapD2) oder 60 sec (Barren-FE). Zur quantitativen Analyse wurde die RFI gegen die Zeit aufgetragen. Die RFI wurde als Verhältnis aus der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des gebleichten Metaphasechromatins und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des ungebleichten Metaphasechromatins errechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. n = 7 für EGFP-CapD2 und n = 4 für Barren-FE. Maßstab: 15 µm

2.2.3 Aurora B Kinase spielt eine untergeordnete Rolle bei der meiotischen Chromatin-assoziaton von Condensin I

Die Wechselwirkung der Condensin-Komplexe mit dem Chromatin stellt ein kritisches Ereignis für die Assemblierung von Chromosomen sowie deren Segregation in Anaphase dar. Folglich müssen sowohl der Zeitpunkt als auch die Dauer der Chromatinassoziaton strikt kontrolliert werden. Trotz der enormen Relevanz der Chromatinassoziaton von Condensin sind die zugrundeliegenden Mechanismen, welche diesen Prozess steuern, nur unzureichend aufgeklärt.

Für eine Reihe mitotischer Kinasen konnte gezeigt werden, dass diese die Lokalisation von Condensin phosphorylierungsabhängig regulieren. Genetische und cytologische Analysen in diversen Modellsystemen, darunter *D. melanogaster*, weisen übereinstimmend auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Aurora B Kinase-Aktivität und der Chromatin-assoziaton von Condensin hin: Die Inaktivierung von Aurora B führt zu einer fehlerhaften Rekrutierung von Condensin an das mitotische Chromatin (Giet and Glover, 2001; Hagstrom et al., 2002; Kaitna et al., 2002; Lipp et al., 2007; Tada et al., 2011). Sowohl in *S. pombe* als auch in humanen HeLa-Zellen beruht die Aurora B-abhängige Chromatinassoziaton von Condensin I maßgeblich auf der Phosphorylierung der Kleisin-Untereinheit Cnd2 bzw. CapH (Tada et al., 2011). Die N-terminale Region dieser Proteine zeichnet sich durch das Vorhandensein mehrerer Aurora B-Konsensussequenzen aus. Durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente konnte in *S. pombe* eine Aurora B-abhängige Phosphorylierung an drei konservierten Aminosäurepositionen (S5, S41 und S52) nachgewiesen werden, während in humanen Zellen ein einzelner Serinrest (S70) als Aurora B-Phosphorylierungsstelle fungiert (Tada et al., 2011). Ein vergleichendes Sequenzalignment mit humanem CapH identifiziert die Aminosäure Threonin 43 als entsprechende Phosphorylierungsstelle des *D. melanogaster* Orthologs Barren, da diese unmittelbar innerhalb eines Konsensusmotivs für Aurora B Kinase in einem stark konservierten Sequenzabschnitt liegt (Abb. 14 A).

Zur Untersuchung der Signifikanz der Aurora B-abhängigen Phosphorylierung von Barren für die Chromatinassoziaton von Condensin I in Meiose, wurden transgene Fliegenlinien generiert, welche eine EGFP-markierte Variante von Barren (Barren-EGFP-T43A) exprimieren, die durch den Austausch von Threonin 43 zu Alanin an dieser Position nicht mehr durch Aurora B phosphoryliert werden kann.

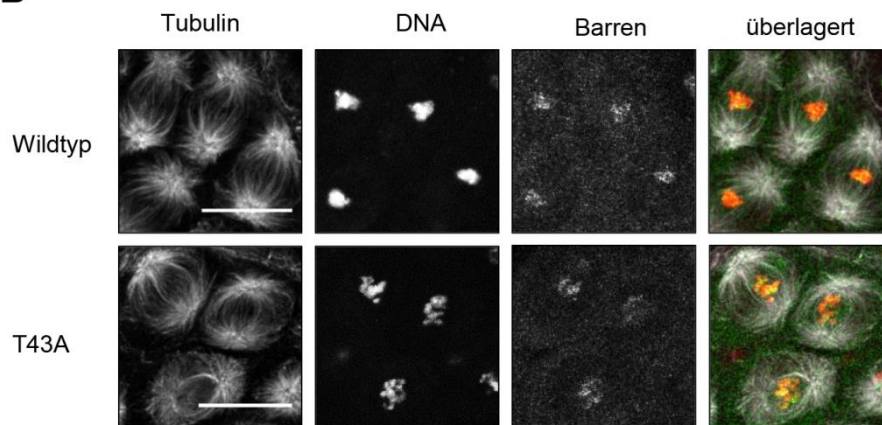
A

Aurora B Konsensus [K/R]-X-[S/T]-[ILV]

```

hCapH  MGPPGPALPATMNNSSSETRGHPHSAS----SPSER-VFPMPLPRKAPLN 45
DmCapH  -----MTLPRLETPLRRAVG-----SYQEGVS----- 23
          ▲
IPGTPVLEDFPQNDDEKERLQ-RRRSRVFDLQFS-TDSPRLASPSS-RSIDISA-T 98
-----RMLTPFNDDEAERREARRRTLQQHH-----R 50
    
```

B



C

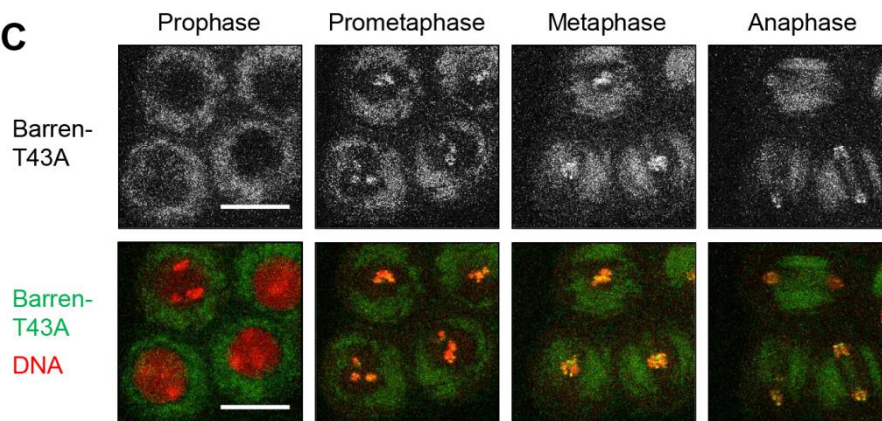


Abbildung 14 | Die Phosphorylierung von Barren an Position T43 ist nicht erforderlich für die Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose A) Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von humanem CapH und *D. melanogaster* Barren. Die Aurora B-Konsensussequenz ist grau hinterlegt. Die rote Pfeilspitze markiert die potentielle Phosphorylierungsstelle durch Aurora B Kinase (Serin 70 bzw. Threonin 43). Stark konservierte Sequenzbereiche sind grün unterstrichen. B) Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation von Barren-EGFP und Barren-EGFP-T43A in Metaphase I-Spermatozyten. Adulte Testes der Genotypen *+/+*; *UASP-Barren-EGFP/bam-Gal4-VP16* und *+/+*; *UASP-Barren-EGFP-T43A/bam-Gal4-VP16* wurden präpariert, fixiert und mit gegen α -Tubulin (weiß) und EGFP (grün) gerichteten Antikörpern gefärbt. Die Färbung der DNA (rot) erfolgte mit Hoechst 33258. C) *In vivo* Mikroskopie von Meiose I. Es sind repräsentative Aufnahmen einzelner Meiose I-Stadien gezeigt. Die untersuchten Zysten (*+/+*; *UASP-Barren-EGFP-T43A/His2Av-mRFP III.1, bam-Gal4-VP16*) exprimieren His2Av-mRFP (rot) sowie Barren-EGFP-T43A (grün). Maßstab: 15 μ m

Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zeigen, dass die Chromatinassoziation der Mutante Barren-T43A im Vergleich zur wildtypischen Variante nicht wesentlich beeinträchtigt ist (Abb. 14 B). Trotz Mutation der mutmaßlichen Aurora B-Phosphorylierungsstelle kann eine deutliche Akkumulation von Barren-T43A am Chromatin in Metaphase I beobachtet werden. Das finale Level an Chromatin-gebundenem Barren-T43A ist dabei mit dem von wildtypischem Barren vergleichbar. Für eine detaillierte Untersuchung der chromosomalen Lokalisation von Barren-T43A im Verlauf von Meiose wurden *in vivo* mikroskopische Analysen an Meiose I-Spermatozyten durchgeführt (Abb. 14 C). Auch diese weisen auf ein unverändertes Lokalisationsverhalten von Barren-T43A in Meiose hin. Die initiale Ladung von Barren-T43A erfolgt nach NEBD in Prometaphase. Bis zur beginnenden Dekondensation am Ende von Anaphase bzw. früher Telophase bleibt es stabil mit dem Chromatin assoziiert. Die mutmaßlich nicht phosphorylierbare Variante reflektiert somit das Lokalisationsmuster des wildtypischen Barren-Proteins (vgl. Abb. 12). Die Phosphorylierung von Threonin 43 scheint demnach für eine Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose nicht notwendig zu sein. Dabei bleibt jedoch unklar, ob die Aurora B-abhängige Phosphorylierung von Barren *per se* für die Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose hinfällig ist oder ob es der Phosphorylierung anderer Reste oder anderer Untereinheiten durch Aurora B Kinase bedarf.

Um die Frage zu beantworten, ob die Kinaseaktivität von Aurora B generell für die Chromatinlokalisierung von Condensin I in Meiose relevant ist, wurde der Effekt der Aurora B Inaktivierung auf die Lokalisation der Kleisin-Untereinheit Barren analysiert. Durch Expression einer spezifisch gegen Aurora B gerichteten siRNA wurde Aurora B in der männlichen Keimbahn depletiert (Abb. 15 A). Zwar war es nicht möglich die Effizienz der Depletion immunologisch nachzuweisen, da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand. Ein eindeutiges Indiz für eine effiziente Depletion von Aurora B jedoch ist das Auftreten von multipolaren Spindeln (Abb. 15 A). Die Inaktivierung von Aurora B scheint jedoch lediglich einen moderaten Effekt auf die Chromatinlokalisierung von Barren auszuüben. In immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen von Metaphase I-Spermatozyten kann keine Delokalisation von Barren am Chromatin nachgewiesen werden, wenn auch das Level an Chromatin-gebundenem Barren im Vergleich zu unbehandelten Spermatozyten geringfügig reduziert zu sein scheint (Abb. 15 A).

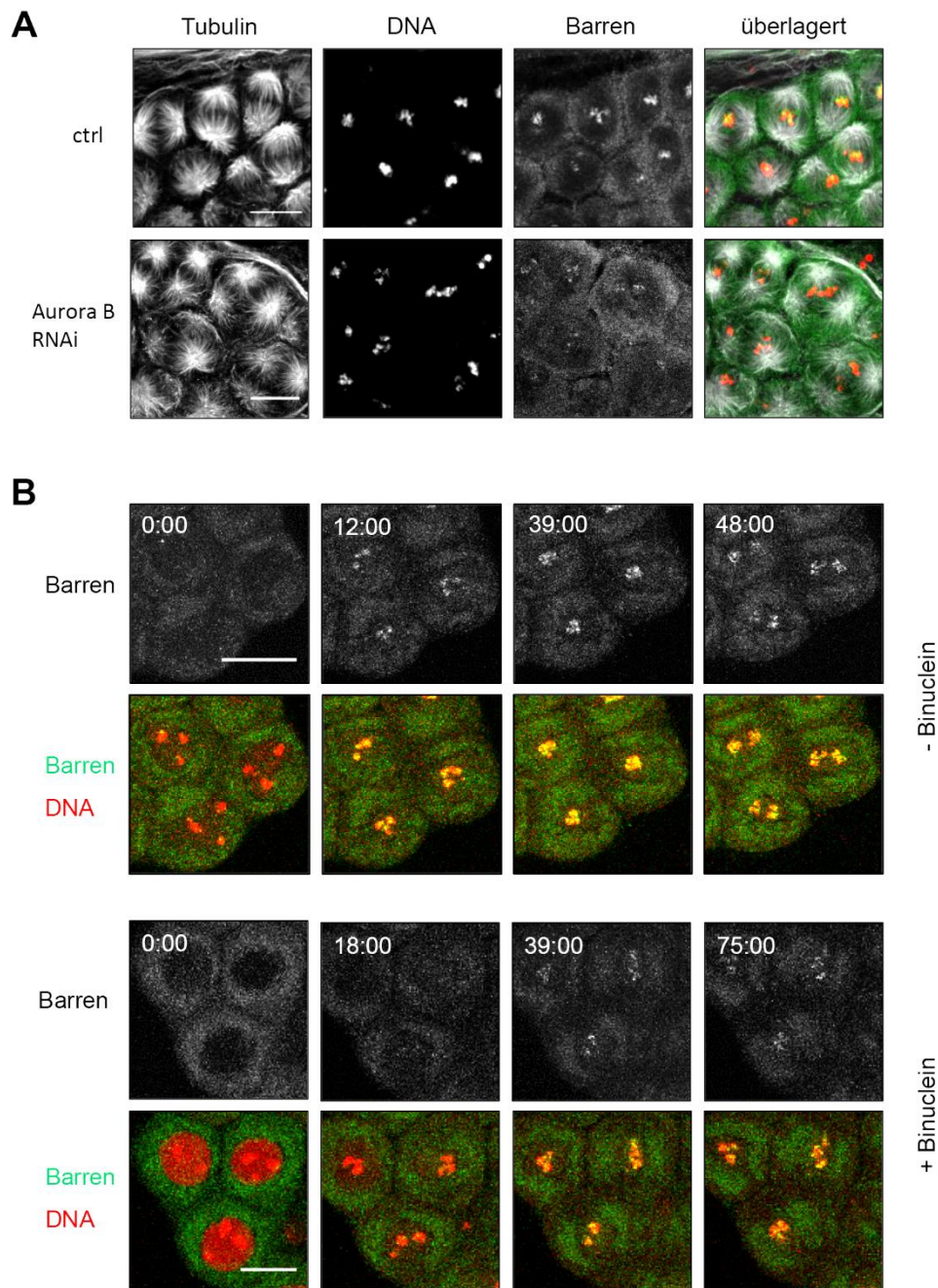


Abbildung 15 | Die Inaktivierung von Aurora B Kinase hat einen schwachen Effekt auf die Chromatin-assoziaton von Barren in Meiose A) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Spermatozyten in Metaphase I zum Vergleich der Chromatinassoziaton von Barren mit und ohne Expression von Aurora B siRNA unter Kontrolle von *bam-Gal4*. Adulte Hoden wurden präpariert, fixiert und mit gegen α -Tubulin (weiß) und Barren (grün) gerichteten Antikörpern gefärbt. Die Färbung der DNA (rot) erfolgte mit Hoechst 33258. B) *In vivo* Mikroskopie von Meiose I. Die untersuchten Zysten exprimieren His2Av-mRFP (rot) sowie Barren-EGFP (grün). Zysten wurden aus pupalen Hoden des Genotyps *His2Av-mRFP II.2/CyO; Barren-EGFP/TM3,Ser* präpariert und unter Zugabe von 50 μ M Binuclein 2 für 1 h kultiviert. Die Aufnahme einzelner Bilder erfolgte in zeitlichen Intervallen von jeweils 3 min. Die angegebenen Zeitpunkte repräsentieren die Zeitpunkte nach Start der Aufnahme. Maßstab: 15 μ m.

Um die Auswirkungen der Aurora B Suppression im Hinblick auf die Dynamik der Chromatinassoziation von Condensin detaillierter untersuchen zu können, wurde Aurora B Kinase durch Zugabe von Binuclein 2 inaktiviert und der Ablauf der Meiose in Echtzeit verfolgt (Abb. 15 B). Bei Binuclein 2 handelt es sich um einen Isoform-spezifischen Inhibitor von *D. melanogaster* Aurora B Kinase, welcher mit ATP um die Bindung in deren aktivem Zentrum kompetitiert (Smurnyy et al., 2010). Die erfolgreiche Inaktivierung von Aurora B nach Behandlung der Zysten mit Binuclein 2 wurde durch eine starke Verzögerung der meiotischen Progression angezeigt. Die Inaktivierung von Aurora B führt in mitotischen Zellen nachweislich zu Segregationsdefekten und infolgedessen zu einer transienten Aktivierung des mitotischen *checkpoints* (Giet and Glover, 2001; Smurnyy et al., 2010). Binuclein 2-behandelte Zellen persistieren über einen längeren Zeitraum in Metaphase als unbehandelte Zellen und unterliegen einer vorzeitigen Chromosomendekondensation ohne vorhergehende Segregation. Trotz Inhibition der katalytischen Aktivität von Aurora B Kinase kann eine Assoziation von Barren mit dem Chromatin dokumentiert werden (Abb. 15 B). Die Lokalisation von Barren entspricht dabei dem für Barren beschriebenen, charakteristischen Lokalisationsprofil beginnend von Prometaphase bis zu beginnender Dekondensation des Chromatins (vgl. Abb. 12). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen ist das Level des Chromatin-gebundenen Proteins jedoch augenscheinlich geringfügig reduziert. Um eine exakte Aussage über die Menge des Chromatin-assoziierten Proteins treffen zu können, müsste die Fluoreszenzintensität in mehreren unabhängigen Experimenten determiniert werden. Auf Grundlage der hier gezeigten Daten muss davon ausgegangen werden, dass Aurora B-Kinase, keine oder lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose spielt.

2.3 Funktionelle Charakterisierung von Condensin I in der männlichen Meiose von *D. melanogaster*

2.3.1 Charakterisierung des RNAi-vermittelten Abbaus der mRNA von Condensin-Untereinheiten in der Keimbahn

Um zu untersuchen, ob der kanonische Condensin I-Komplex in *D. melanogaster* eine funktionell relevante Rolle in der männlichen Meiose ausübt, sollte dieser in der männlichen Keimbahn inaktiviert und die phänotypischen Auswirkungen charakterisiert werden. Da es

sich bei den für die Condensin I-Untereinheiten kodierenden Gene um für die mitotische Proliferation und Viabilität der Fliegen essentielle Gene handelt, erweisen sich klassische *loss-of-function* Mutationen als ungeeignet, um potentielle Effekte auf die meiotische Progression untersuchen zu können. Alternativ sollte die Inaktivierung von Condensin daher über die Methode der RNA-Interferenz erfolgen. Durch Expression spezifischer siRNAs unter Kontrolle des binären Gal4/UAS-Systems wird eine konditionale und gewebespezifische Geninaktivierung ermöglicht. Für die Inaktivierung von Condensin I sollten die Proteine SMC2, repräsentativ für beiden SMC-Untereinheiten, CapG, repräsentativ für die peripheren HEAT-Untereinheiten, sowie die Kleisin-Untereinheit Barren depletiert werden. Um eine grundlegende Aussage über die Funktionalität der verwendeten siRNAs treffen zu können, wurden diese zunächst unter Kontrolle des Promotors *eyeless* in mitotisch proliferierendem Gewebe während der frühen Augen- und neuronalen Hirnentwicklung exprimiert (Halder et al., 1995; Hazelett et al., 1998). Die Inaktivierung von Condensin I sollte in proliferierendem Gewebe erwartungsgemäß eine hohe Toxizität aufweisen, da die mitotische Chromosomensegregation durch das Fehlen von Condensin stark beeinträchtigt ist. Die ektopische Expression der gegen SMC2, Barren und CapG gerichteten siRNAs führt in allen Fällen zu pupaler Letalität der betreffenden Individuen (vgl. Abb. 17), was für eine erfolgreiche Inhibition der Condensin-Aktivität als Folge des RNAi-vermittelten Abbaus der einzelnen Untereinheiten spricht. Zur Depletion von Condensin I in der männlichen Keimbahn wurden die siRNAs unter Kontrolle von *bam-Gal4-VP16* exprimiert.

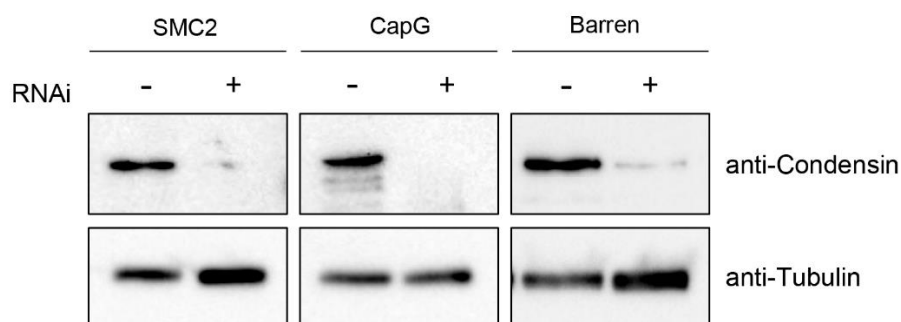
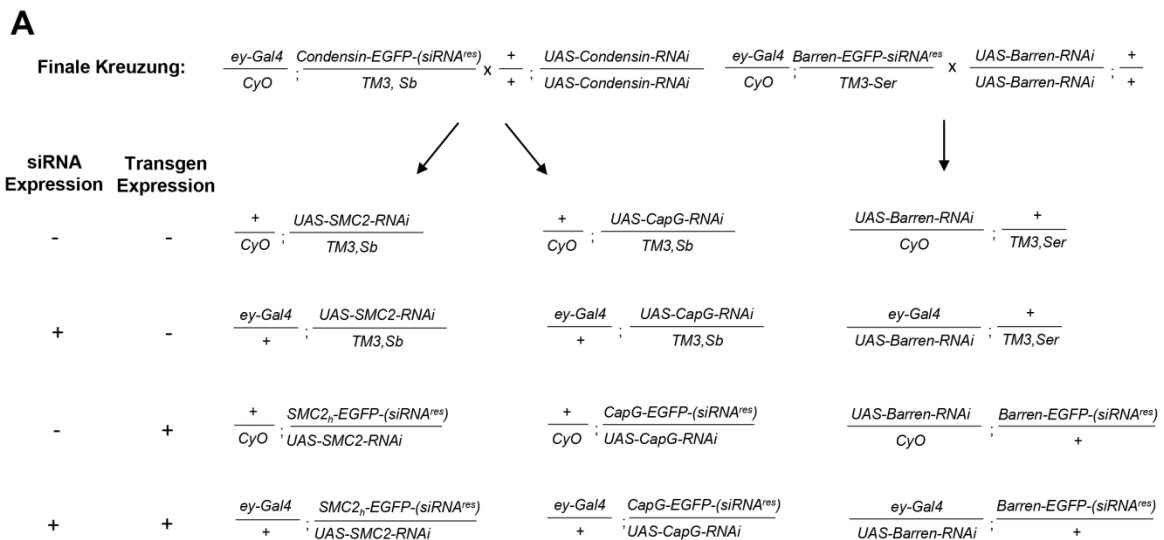


Abbildung 16 | Depletion von Condensin-Untereinheiten durch RNAi-vermittelte Degradation in der männlichen Keimbahn. Für den immunologischen Nachweis der Proteinlevel von SMC2, CapG und Barren nach Expression der jeweiligen siRNAs wurden Proteinextrakte aus jeweils 10 pupalen Hoden der Genotypen *UAS-Barren-RNAi/+; bam-Gal4-VP16/+* und *+/+*; *UAS-SMC2-RNAi/bam-Gal4-VP16* und *+/+*; *bam-Gal4-VP16/UAS-CapG-RNAi* sowie *bam-Gal4-VP16 (-)* geladen. Die Sondierung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SMC2, CapG und Barren sowie α -Tubulin als Ladekontrolle.

Die *bam-Gal4* getriebene Expression beginnt ab dem 8-Zell-Stadium der sich mitotisch teilenden Spermatogonien und sinkt im Laufe der Spermatozytenreifung langsam ab (White-Cooper, 2012). Bei Eintritt in die Meiose sollten die Condensin-Untereinheiten somit erwartungsgemäß effizient depletiert sein. Zur Abschätzung der Depletionseffizienz wurden Proteinextrakte aus Hoden erzeugt und die Proteinmenge mit und ohne Expression der entsprechenden siRNAs immunologisch untersucht. Durch Expression der siRNAs kann eine signifikante Reduktion der endogenen Proteinlevel von SMC2, CapG und Barren in der männlichen Keimbahn hervorgerufen werden (Abb.16).

Ein weiteres Kriterium für die Qualität von siRNAs ist, neben einer ausreichend hohen Depletionseffizienz, die Spezifität des RNAi-vermittelten Abbaus. Andernfalls würden hervorgerufene Phänotypen als Resultat von etwaigen *off-target*-Effekten fehlinterpretiert werden. Um die Spezifität der Depletion zu verifizieren, sollten siRNA-resistente Varianten der Gene für SMC2, CapG sowie Barren erzeugt und die durch den RNAi-abhängigen Abbau hervorgerufenen Phänotypen durch deren Expression gerettet werden. Um zu gewährleisten, dass eine mRNA nicht mehr durch die korrespondierende siRNA degradiert werden kann, muss bei siRNA-resistenten Transgenen der zur siRNA komplementäre Sequenzabschnitt durch gerichtete Mutagenese modifiziert werden ohne die physiologische Funktionalität des translatierten Genprodukts zu beeinflussen. Die Degeneriertheit des genetischen Codes ermöglicht es, die kodierende Sequenz durch einzelne Basenaustausche zu modifizieren, ohne das Kodierungspotential und die Primärstruktur des resultierenden Proteins zu verändern. Die unterschiedliche Beschaffenheit der verwendeten UAS-RNAi-Konstrukte stellt zugleich unterschiedliche Anforderungen an die die Resistenz vermittelnden Sequenzmodifikationen. Während die für den Abbau von SMC2 und CapG verwendeten Linien kurze, 21 Nukleotide lange shRNAs kodieren (Ni et al., 2011), erfolgt im Fall von Barren die Synthese einer langen *hairpin* RNA (530 bp), welche erst innerhalb der Zelle zu mehreren aktiven siRNAs prozessiert wird. Um eine vollständige Resistenz gegen alle potentiell prozessierten siRNAs zu gewährleisten, musste folglich der gesamte 530 bp umfassende Sequenzabschnitt in *Barren* mutiert werden. Im Fall von SMC2 und CapG hingegen genügte die Basenmodifikation der 21 nt langen siRNA Zielsequenzen (siehe Anhang, Abb. 38).

Da sich aufgrund der Komplexität der erforderlichen Kreuzungsschritte Rettungsexperimente in der männlichen Keimbahn äußerst schwierig gestalten, sollten diese sowohl in mitotischem Gewebe als auch in der weiblichen Keimbahn durchgeführt werden. Zuerst sollte versucht werden durch ektopische Expression der siRNA-resistenten Transgene die durch die RNAi-vermittelte Depletion von Condensin I in der Augenimaginalscheibe hervorgerufene pupale Letalität zu retten (Abb. 17).



B

siRNA Expression	Transgen Expression	SMC2 _{tr} -EGFP	SMC2 _{tr} -EGFP-siRNA ^{res}	CapG-EGFP	CapG-EGFP-siRNA ^{res}	Barren-EGFP	Barren-EGFP-siRNA ^{res}
-	-	22 (42 %)	54 (38 %)	36 (51 %)	39 (27 %)	97 (46 %)	107 (28 %)
+	-	-	-	-	-	1 (0,5 %)	1 (0,3 %)
-	+	31 (58 %)	51 (35 %)	34 (49 %)	54 (38 %)	108 (51 %)	103 (27 %)
+	+	-	39 (27 %)	-	49 (35 %)	5 (2,5 %)	165 (44 %)

Abbildung 17 | Komplementation der Letalität nach RNAi-vermitteltem Abbau von Condensin-Untereinheiten durch ektopische Expression siRNA-resistenter Transgene A) Finale Kreuzungsschritte zur Durchführung des Rettungsexperiments. Die für CapG und SMC2 durchgeführten Kreuzungsschritte sind analog und wurden als „Condensin-RNAi“ zusammengefasst. Die erwarteten Genotypen einer jeden Kreuzung sind unten aufgelistet. Zur Vereinfachung wurden diese nach Expression des Transgens und Expression der siRNA mit + bzw. - kategorisiert. Die Bezeichnung Condensin-EGFP-(siRNA^{res}) indiziert optional die wildtypische oder siRNA-resistente Variante. B) Quantifizierung der Nachkommenschaft aus den finalen Kreuzungen entsprechend der jeweiligen Genotypen. Angegeben sind sowohl die absoluten Zahlen als auch der errechnete prozentuale Anteil gemessen an der Gesamtzahl aller quantifizierten Individuen. Anzahl und prozentualer Anteil der geretteten Individuen sind durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben.

Eine Suppression dieses Phänotyps würde sich durch eine Aufhebung der Letalität und dem Auftreten von lebensfähigen Individuen äußern. Dazu wurden Fliegen generiert, die neben dem Gal4-Treibertransgen (*ey-Gal4*) und dem jeweiligen UAS-RNAi-Konstrukt (*UAS-Condensin-RNAi*) das korrespondierende siRNA-resistente Transgen (*Condensin-EGFP-siRNA^{res}*) besitzen (Abb. 17 A). Als Kontrolle wurde ein analoges Experiment mit einem wildtypischen, nicht-resistenten EGFP-markierten Transgen (*Condensin-EGFP*) durchgeführt. In allen drei Fällen kann die pupale Letalität durch Integration des jeweiligen siRNA-resistenten Transgens komplementiert werden (Abb. 17 B). Die geretteten Individuen (*ey-Gal4/+; SMC2_h-EGFP-siRNA^{res}/UAS-SMC2-RNAi* oder *ey-Gal4/+; CapG-EGFP-siRNA^{res}/UAS-CapG-RNAi* oder *ey-Gal4/UAS-Barren-RNAi; Barren-EGFP-siRNA^{res}/+*) treten mit annähernd der nach Mendel zu erwartenden Häufigkeit von 33 % auf. Individuen, welche eine wildtypische Kopie des Transgens anstelle der siRNA-resistenten Variante exprimieren, treten unter den Nachkommen entsprechend den Erwartungen nicht auf (Abb. 17 B). Lediglich im Fall von Barren konnten auch solche Individuen (*ey-Gal4/UAS-Barren-RNAi; Barren-EGFP/+*) nachgewiesen werden, wenn auch mit einer geringen Häufigkeit von 2,5 %. Da derartige „Escaper“-Individuen auch nach RNAi in Abwesenheit eines weiteren Transgens zu verzeichnen waren (*ey-Gal4/UAS-Barren-RNAi; +/TM3,Ser*), deutet dies auf einen ineffizienten Abbau der mRNA von Barren hin. Ein Anteil der geretteten Individuen von etwa 10-20 % in allen drei Fällen weist zudem eine abnormale Augenmorphologie auf. Das Auftreten des deformierten Augenphänotyps spricht dafür, dass der durch Expression der Condensin-spezifischen siRNAs erzeugte Phänotyp in diesen Individuen durch Einbringen des entsprechenden Rettungstransgens nicht vollständig gerettet, sondern lediglich teilweise supprimiert wird.

Um die Spezifität der Depletion auch auf molekularer Ebene bestätigen zu können, wurden die jeweiligen RNAi-Konstrukte für den *knockdown* von SMC2, CapG und Barren während der weiblichen Oogenese unter Kontrolle des maternalen α -Tubulin Promotors exprimiert und die Proteinlevel der wildtypischen und siRNA-resistenten Varianten immunologisch im Western Blot verglichen (Abb. 18). Während die EGFP-markierten, wildtypischen Varianten (SMC2_h-EGFP und CapG-EGFP) nach Induktion des RNAi-vermittelten Abbaus effizient depletiert werden, bleibt das Proteinlevel der siRNA-resistenten Varianten (SMC2_h-EGFP-siRNA^{res} und CapG-EGFP-siRNA^{res}) konstant (Abb. 18). Da die Rettungstransgene im endogenen Hintergrund des jeweiligen Proteins exprimiert werden, kann durch die

Sondierung mit Antikörpern, die gegen die Condensin-Untereinheiten gerichtet sind, gleichzeitig das jeweilige endogene Protein detektiert werden. Die endogenen Proteine werden nach Expression der siRNA erwartungsgemäß ebenfalls abgebaut.

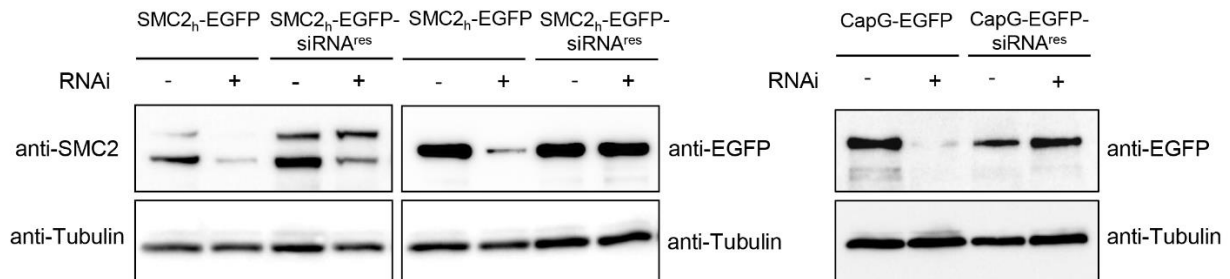


Abbildung 18 | Die Depletion von Condensin-Untereinheiten in der Keimbahn kann durch Expression siRNA-resistenter Transgene gerettet werden. Für den immunologischen Nachweis wurden Proteinextrakte aus Ovarien der Genotypen $\alpha 4 \text{ tub-Gal4-VP16/+}$; $\text{SMC2}_h\text{-EGFP-(siRNA}^{res}\text{)}/\text{UAS-SMC2-RNAi (+)}$ oder $+/\text{CyO}$; $\text{SMC2}_h\text{-EGFP-(siRNA}^{res}\text{)}/\text{UAS-SMC2-RNAi (-)}$ oder $\alpha 4 \text{ tub-Gal4-VP16/+}$; $\text{CapG-EGFP-(siRNA}^{res}\text{)}/\text{UAS-CapG-RNAi (+)}$ oder $+/\text{CyO}$; $\text{CapG-EGFP-(siRNA}^{res}\text{)}/\text{UAS-CapG-RNAi (-)}$ hergestellt. Es wurden jeweils 2 Ovarienäquivalente pro Bahn geladen. Die Sondierung erfolgte mit gegen SMC2, EGFP sowie α -Tubulin gerichteten Antikörpern.

Für den Fall der RNAi-vermittelten Depletion von Barren konnte ein analoger Nachweis nicht erbracht werden, da das UAS-Konstrukt für die gegen Barren gerichtete *hairpin* RNA als Antwort auf Gal4 keine produktive Transkription in der weiblichen Keimbahn erlaubt. UAS-Konstrukte auf Basis von pKC26-Vektoren sind bezüglich des enthaltenen Basalpromotors (hsp70) sowie der regulatorischen 3'-UTR-Sequenzen (SV40) nicht für die Expression während der Oogenese optimiert (Rorth, 1998). Lange Sequenzen, wie die 530 bp umfassende, kodierende Sequenz für den Barren *hairpin*, lassen sich mutmaßlich kaum oder gar nicht exprimieren. Zwar sind auch die für die CapG- und SMC2-spezifischen shRNAs kodierenden UAS-Konstrukte, welche auf Grundlage von Valium20 bzw. Valium20 Plasmiden basieren, nicht expliziert für eine Expression in der weiblichen Keimbahn modifiziert. Kurze shRNAs können mit diesem System augenscheinlich dennoch erfolgreich transkribiert werden. Um die Spezifität der Barren-Depletion dennoch verifizieren zu können, sollte die *hairpin* RNA zukünftig zygotisch oder während der Embryonalentwicklung exprimiert werden und der Abbau der unterschiedlichen Barren-Varianten verfolgt werden.

Anhand der gezeigten genetischen und immunologischen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Expression der siRNAs eine spezifische Depletion der Condensin-Untereinheiten

vermittelt und dass die Phänotypen, die nach RNAi-abhängiger Depletion von SMC2, CapG und Barren auftreten, zumindest in mitotischem Gewebe, durch Expression der korrespondierenden siRNA-resistenten Transgene gerettet werden können. Somit kann die Existenz unspezifischer *off-target*-Effekte weitgehend ausgeschlossen werden. Da die Spezifität der siRNAs sowohl in mitotischem Gewebe als auch in der weiblichen Keimbahn verifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Spezifität auch in der männlichen Keimbahn gegeben ist.

2.3.2 Die Inaktivierung von Condensin I führt zu einer Reduktion der männlichen Fertilität

Um potentielle Effekte der RNAi-vermittelten Inaktivierung des Condensin I-Komplexes auf die männliche Keimzellbildung zu identifizieren, erfolgte die Expression der siRNA-Konstrukte erneut unter der Kontrolle von *bam-Gal4-VP16* in den frühen Stadien der Spermatogenese. Männliche Individuen wurden genetisch auf ihre Fertilität hin untersucht. In zehn unabhängigen Experimenten wurde jeweils ein einzelnes Männchen mit drei wildtypischen, jungfräulichen Weibchen verpaart und die gesamte Nachkommenschaft nach Eiablage über einen definierten Zeitraum von drei Tagen quantifiziert. Die Depletion von SMC2, CapG und Barren führt in allen drei Fällen zu einer signifikanten Reduktion der männlichen Fertilität (Abb. 19). Während Männchen nach *knockdown* von CapG und Barren relativ zu den Kontrollindividuen 37 % bzw. 80 % weniger Nachkommen hervorbringen, hat die Depletion von SMC2 eine vollkommene Sterilität der betreffenden Individuen zur Folge. Um auszuschließen, dass die Zeugungsunfähigkeit einzelner Paarungen auf die Sterilität der weiblichen Fliegen zurückzuführen ist, wurden diese im Anschluss mit wildtypischen Männchen verpaart und das Auftreten vitaler Nachkommen untersucht. Da in allen Paarungsansätzen Nachkommen auftraten, konnte eine weibliche Sterilität als Ursache ausgeschlossen werden. Neben der unterschiedlich starken Reduktion der Fertilität nach Depletion der einzelnen Condensin-Untereinheiten ergeben sich teils erhebliche Schwankungen bezüglich Fertilität in den zehn unabhängigen Kreuzungsansätzen desselben Genotyps (Abb. 19). Diese können sowohl durch die natürliche Variabilität in der Fruchtbarkeit der Individuen als auch durch die allgemeine Fitness einzelner, verpaarter Fliegen bedingt sein.

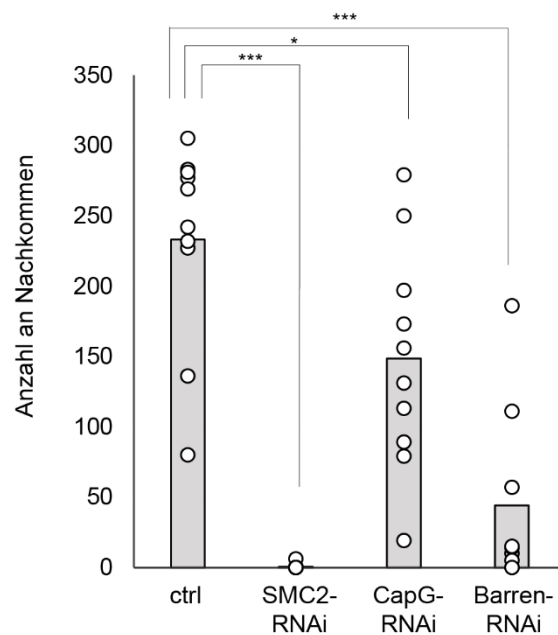


Abbildung 19 | Die Depletion von Condensin I in der männlichen Keimbahn hat eine signifikante Reduktion der männlichen Fertilität zur Folge. Quantifizierung der Nachkommenschaft aus der Kreuzung wildtypischer Weibchen (w) mit Männchen der Genotypen *UAS-Barren-RNAi/+*; *bam-Gal4-VP16/+* oder *+/+*; *UAS-SMC2-RNAi/bam-Gal4-VP16* oder *+/+*; *bam-Gal4-VP16/UAS-CapG-RNAi*. Als Kontrolle (ctrl) wurden Männchen des Genotyps *bam-Gal4-VP16* analysiert. Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel aus der Nachkommenschaft von zehn einzelnen Männchen eines Genotyps. Die statistische Auswertung erfolgte durch *unpaired student's t-test* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Im nächsten Schritt wurde abgeklärt, ob die für die Zeugungsunfähigkeit der Paarungen ursächlichen Defekte vor oder erst nach der Kopulation auftreten. Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob Männchen nach Condensin-Inaktivierung in der Lage sind reife Spermien zu bilden. Männliche Individuen wurden in Abwesenheit von Weibchen gehalten, um zu gewährleisten, dass die produzierten Spermien in den Samenblasen akkumulieren. Nach zehn Tagen wurden die Samenblasen präpariert, fixiert und deren durchschnittliche Größe quantifiziert. Im Gegensatz zu wildtypischen Männchen sind die Samenblasen Condensin-depletierter Individuen deutlich kleiner und mit weniger reifen Spermien angereichert (Abb. 20 A). Die massivste Ausprägung ist erneut im Fall der SMC2-Depletion zu beobachten. Lediglich in vier Fällen waren die Samenblasen als solche identifizierbar. In einem Großteil der Präparate jedoch konnten diese, aufgrund des geringen Volumens, nicht eindeutig vom Gewebe des Samenausführganges unterschieden und somit nicht in die Auswertung einbezogen werden. Das Defizit an reifen Spermien weist daraufhin, dass die beeinträchtigte

Fertilität durch Defekte während der männlichen Keimzellbildung verursacht wird und sich folglich bereits vor der Kopulation manifestiert.

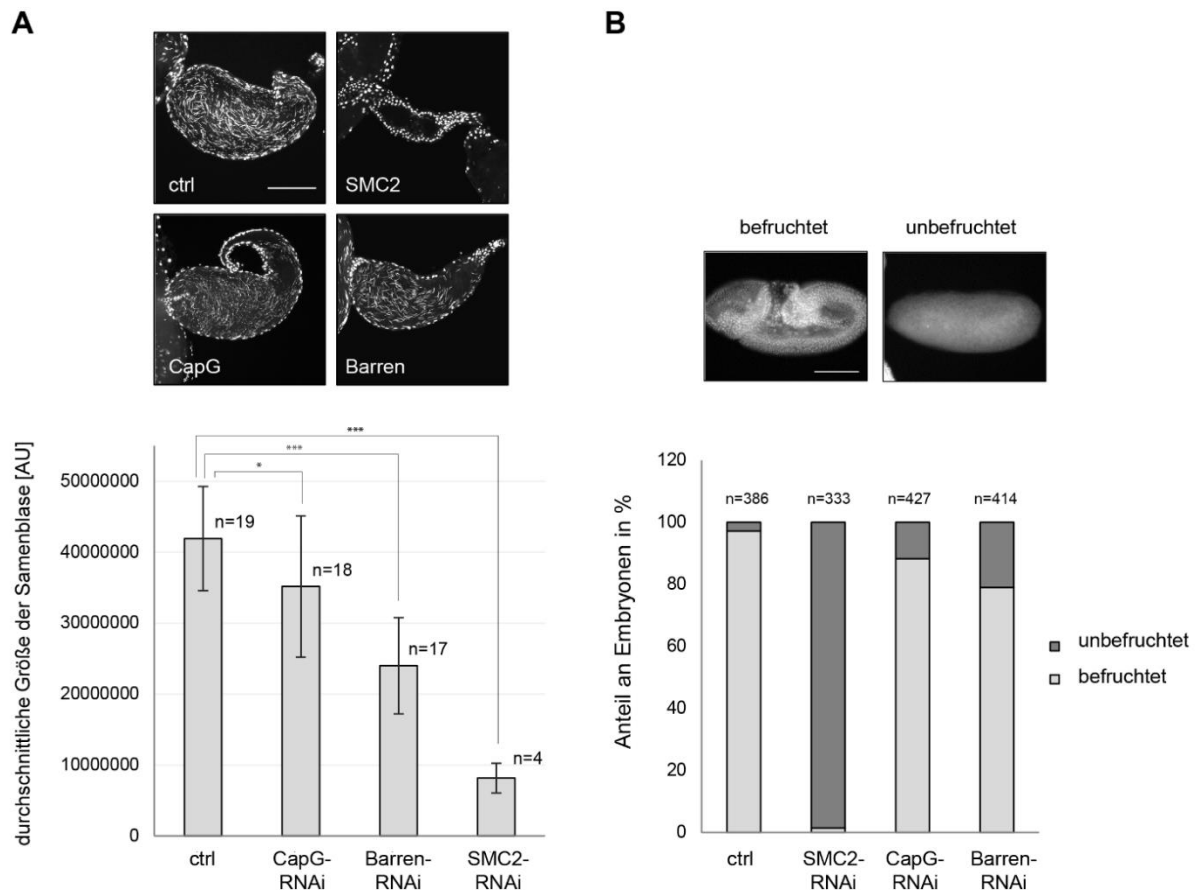


Abbildung 20 | Die Inaktivierung von Condensin I während der Spermatogenese führt zu einem Defizit an reifen Spermien und einer erhöhten Anzahl unbefruchteter Embryonen. A) Männchen der Genotypen *UAS-Barren-RNAi/+; bam-Gal4-VP16/+* oder *+/+; UAS-SMC2-RNAi/bam-Gal4-VP16* oder *+/+; bam-Gal4-VP16/UAS-CapG-RNAi* wurden zehn Tage lang in Abwesenheit von Weibchen in Futterröhrchen gehalten. Oben: Repräsentative Aufnahmen von Samenblasen. Die Samenblasen wurden präpariert, fixiert, mit Hoechst 33258 gefärbt und mikroskopisch durch Aufnahme von z-Stapeln analysiert. Maßstab: 50 µm Unten: Quantifizierung der durchschnittlichen Größe von Samenblasen. Diejenige z-Ebene, in welcher die Samenblasen den größten Durchmesser aufweist, wurde ausgewählt und die Fläche unter Verwendung der Software *ImageJ* quantifiziert. Die Balken repräsentieren die durchschnittliche Fläche der Samenblasen. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte durch *unpaired student's t-test* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). B) Quantifizierung des Anteils an unbefruchteten Embryonen aus Paarungsansätzen von jeweils 30 Männchen des entsprechenden Genotyps (siehe oben) mit 70 wildtypischen Weibchen (*w*). 0-3 h alte Embryonen wurden gesammelt, fixiert und die DNA mit Hoechst 33258 gefärbt. Befruchtete Embryonen können anhand stattfindender mitotischer Proliferation identifiziert werden, unbefruchtete Embryonen weisen als einzige Chromatinmasse den Oozytenkern auf. Maßstab: 100 µm

Darüber hinaus wurden die Embryonen der unterschiedlichen Paarungen auf etwaige Anomalien hin untersucht. Es wurden 0-3 h alte Embryonen gesammelt und die DNA mit Hoechst 33258 visualisiert. Eine detaillierte Betrachtung der abgelegten Embryonen macht deutlich, dass nach Depletion von SMC2, CapG und Barren eine erhöhte Anzahl vermeintlich unbefruchteter Embryonen abgelegt wird (Abb. 20 B). Entsprechende Embryonen sind dadurch charakterisiert, dass in diesen keine embryogenesespezifischen, mitotischen Proliferationsprozesse ablaufen, sondern der weibliche Oozytenkern als einzige DNA-Masse persistiert (Abb. 20 B).

Allerdings ergibt sich, mit Ausnahme von SMC2, eine deutliche Diskrepanz zwischen der Anzahl der Nachkommenschaft und der Quantität an unbefruchteten Embryonen (vgl. Abb. 19 und 20). Entsprechend der Reduktion der Nachkommenschaft wäre ein maßgeblich höherer Prozentsatz an unbefruchteten Embryonen zu erwarten gewesen. Folglich muss in Betracht gezogen werden, dass es eine Subfraktion von Embryonen gibt, welche zwar befruchtet ist, jedoch im Laufe der Embryonalentwicklung stirbt. Eine mögliche Ursache für die eingeschränkte Vitalität und die embryonale Letalität sind genetische Defekte der betroffenen Embryonen, welche durch Gendosiseffekte in Folge einer Befruchtung mit aneuploiden Spermien hervorgerufen werden.

2.3.3 Die Inaktivierung von Condensin I hat eine aberrante Chromosomensegregation zur Folge

Eine häufige Ursache von numerischen Chromosomenaberrationen in Keimzellen sind Fehler im Verlauf der Meiose, speziell während der Segregation des genetischen Materials in Anaphase I und II. Um die Ursache des beobachteten Fertilitätsverlusts genauer identifizieren zu können, sollte der Prozess der Keimzellbildung auf cytologischer Ebene analysiert werden. Um die meiotische Progression in Abwesenheit eines funktionellen Condensin I-Komplexes *in vivo* beobachten zu können, wurden Fliegenlinien erzeugt, welche die rot-fluoreszierende Variante des Histons 2Av exprimieren und zugleich einzelne Condensin-Untereinheiten über RNAi depletieren. Die unmittelbar auf den NEBD folgende Phase ist durch zwei grundlegende Prozesse gekennzeichnet: die Chromosomen der vier meiotischen Bivalente werden zunehmend kondensiert und in der Metaphaseplatte innerhalb der Meiosespindel ausgerichtet. Beide Prozesse, Chromosomenkondensation- und

alignment, scheinen trotz der verminderten Funktionalität von Condensin nicht merklich beeinträchtigt zu sein (Abb. 21).

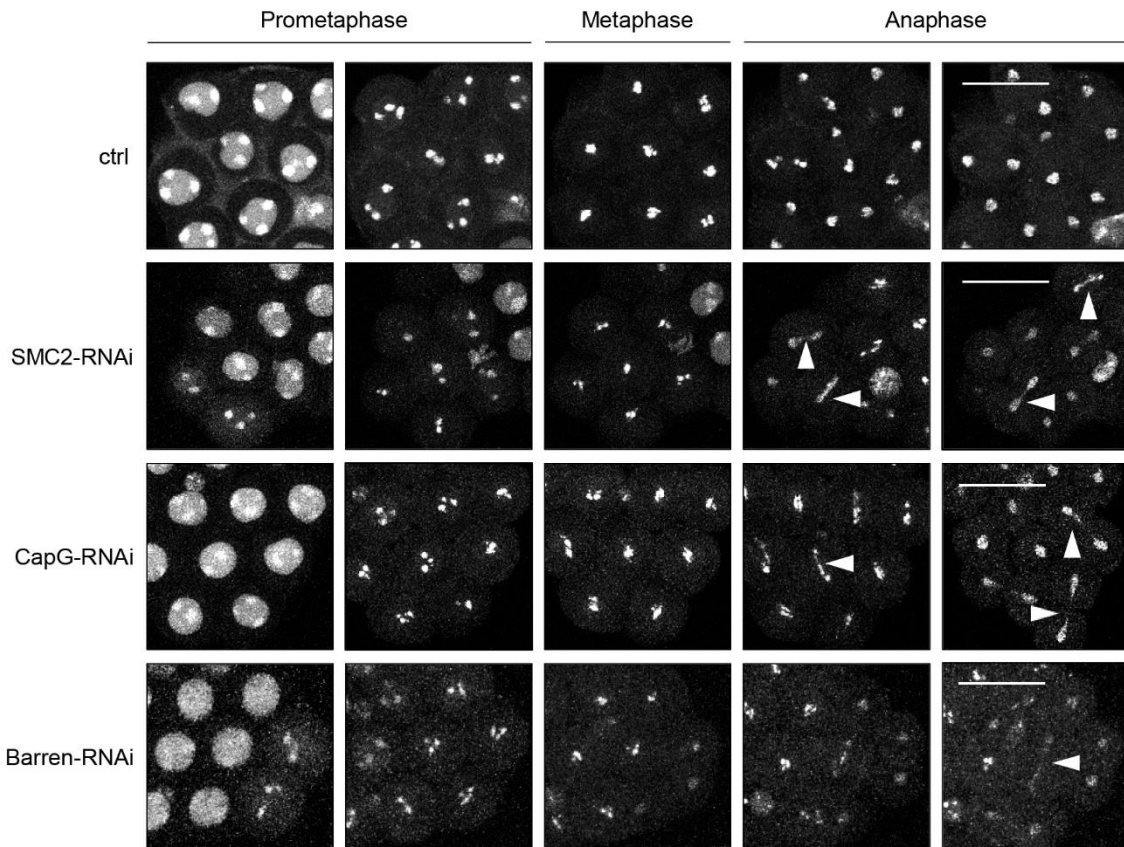


Abbildung 21 | Die keimbahnspezifische Depletion von Condensin I-Untereinheiten führt zu einer fehlerhaften Chromosomensegregation in Meiose. *In vivo* Mikroskopie von primären Spermatozyten aus Männchen der Genotypen *UAS-Barren-RNAi/+*; *His2Av-mRFP III.1*, *bam-Gal4-VP16/+* oder *+/+*; *UAS-SMC2-RNAi/His2Av-mRFP III.1*, *bam-Gal4-VP16* oder *+/+*; *UAS-CapG-RNAi/His2Av-mRFP III.1*, *bam-Gal4-VP16* sowie *+/+*; *His2Av-mRFP III.1*, *bam-Gal4-VP16/+* (ctrl). Zysten wurden aus den Hoden früher Pupalstadien isoliert und kultiviert. Es ist der Verlauf von Meiose I mit repräsentative Aufnahmen verschiedener Meiose I-Stadien gezeigt. Auffällige Anaphasefiguren sind mit einem Pfeilkopf markiert. Maßstab: 20 μ m

Obwohl nur mild ausgeprägte Veränderungen der Chromosomenmorphologie mit dem experimentellen System nicht detektiert werden können, deutet dies daraufhin, dass Condensin für die grundlegende Assemblierung meiotischer Chromosomen entbehrlich zu sein scheint. Dies ist konsistent mit sich in der Literatur häufenden Daten, wonach eine Condensin-Depletion zwar die Struktur mitotischer und meiotischer Chromosomen beeinflusst, die Kompaktierung des Chromatins jedoch nur unwesentlich beeinträchtigt

(Hagstrom et al., 2002; Hudson et al., 2003; Jager et al., 2005; Ono et al., 2003; Savvidou et al., 2005; Steffensen et al., 2001; Yu and Koshland, 2003). Folglich muss davon ausgegangen werden, dass auch in der männlichen Meiose von *D. melanogaster* alternative Mechanismen existieren, welche den Verlust von Condensin kompensieren und Chromosomenkondensation vermitteln. Im Gegensatz zu einer unbeeinträchtigten Prometa- und Metaphase offenbaren sich nach Depletion von SMC2, CapG und Barren sichtbare Auswirkungen auf die Chromosomensegregation in Anaphase. In einer Vielzahl sich teilender Spermatozyten im Condensin-depletierten Hintergrund treten auffällige Anaphase- und Telophasefiguren auf (Abb. 21).

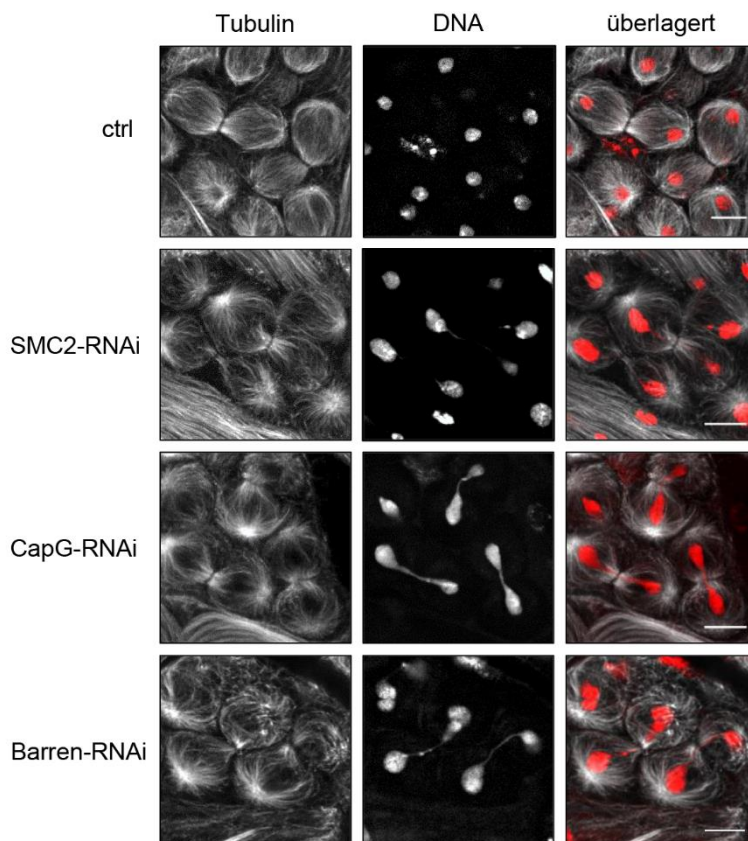


Abbildung 22 | Die Depletion von SMC2, CapG und Barren führt zu Anaphasebrücken zwischen segregierenden Chromosomen in Anaphase I. Vergleich von Anaphase I-Figuren im wildtypischen und Condensin-depletierten Hintergrund. Testes aus adulten Männchen der Genotypen *UAS-Barren-RNAi/+*; *bam-Gal4-VP16/+* oder *+/+*; *UAS-SMC2-RNAi/bam-Gal4-VP16* oder *+/+*; *UAS-CapG-RNAi/bam-Gal4-VP16* sowie *w* (ctrl) wurden präpariert, fixiert und immunhistologisch gefärbt. Die Färbung von Tubulin erfolgte mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper (weiß). Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt (rot). Maßstab: 10 μ m

Obwohl der Eintritt in die Anaphase zunächst korrekt erfolgt, werden die beiden Chromosomenmassen nicht ordnungsgemäß voneinander getrennt. Um höher auflösende Aufnahmen individueller Anaphase I-Figuren zu erhalten, wurden fixierte Präparate adulter Testes hergestellt und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 22). Die IF-Aufnahmen offenbaren persistierende Verbindungen von Chromatinsträngen in Anaphase I nach Depletion von SMC2, CapG und Barren (Abb. 22). Chromatinbrücken zwischen Schwesterchromatiden in Anaphase II können ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das Auftreten von Anaphasebrücken nach *knockdown* von SMC2, CapG und Barren reflektiert den Phänotyp der Condensin-Depletion in mitotisch proliferierenden Zellen (Bhat et al., 1996; Green et al., 2012; Hagstrom et al., 2002; Savvidou et al., 2005; Jager et al., 2005). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Condensin I-Komplex in *D. melanogaster* Männchen zwar nicht für die Chromosomenkompaktierung, jedoch für eine fehlerfreie Chromosomensegregation in Meiose erforderlich ist.

2.3.4 Fehler bei der meiotischen Chromosomensegregation führen zur Entstehung aneuploider Keimzellen

Chromosomensegregationsdefekte stellen eine potentielle Quelle genomischer Instabilität dar und können zu DNA-Brüchen, chromosomalen Fehlverteilungen und infolgedessen zu numerischen Chromosomenaberrationen führen. Um zu untersuchen, ob die durch Condensin-Inaktivierung hervorgerufenen Segregationsdefekte in Meiose chromosomale Fehlverteilungen nach sich ziehen, wurden klassische *Nondisjunction*-Analysen durchgeführt (Abb. 23). Bei diesen auf Kreuzungsexperimenten basierenden, genetischen Tests kann nachgewiesen werden, ob männliche Individuen eine erhöhte Anzahl aneuploider Keimzellen bilden. Fehler bei der meiotischen Chromosomensegregation können bei diesen Tests anhand von phänotypischen Veränderungen in der Folgegeneration detektiert werden. Durch die Befruchtung mit aneuploiden Spermien entstehen abnormale Nachkommen, die sich von den normalen, durch Befruchtung mit euploiden Spermien gezeugten Nachkommen, differenzieren lassen. Um die Fehlsegregation im Fall von Autosomen analysieren zu können, wurden die zu untersuchenden Männchen mit genetisch manipulierten Weibchen verpaart, welche das „Compound“-Chromosom *C(4)RM, ci¹ ey^R* tragen.

A

IV.Chromosom <i>Nondisjunction</i>		<i>X-Y-Nondisjunction</i>	
Genotyp	Phänotyp	Genotyp	Phänotyp
[0 / +	wt]	XX	Weibchen, wt
<i>C(4)RM, ci¹ ey^R / +</i>	wt	<i>XY,B^s</i>	Männchen, <i>B^s</i>
0 / 0	letal	X0	Männchen, wt
<i>C(4)RM, ci¹ ey^R / 0</i>	<i>ey^R</i>	<i>XXY,B^s</i>	Weibchen, <i>B^s</i>
0 / ++	wt		
[<i>C(4)RM, ci¹ ey^R / ++</i>	wt]		

B

	männlich			weiblich			gesamt		
	n	wt	<i>ey^R</i>	n	wt	<i>ey^R</i>	n	<i>ey^R</i>	% <i>ey^R</i>
ctrl	677	677	0	680	679	1	1357	1	0,07
Solo	226	176	50	185	159	26	411	76	18,49
CapG	1020	800	220	492	399	93	1512	313	20,50
Barren	341	286	55	196	174	22	537	77	14,34

	männlich			weiblich			gesamt		
	n	<i>XY,B^s</i>	X0	n	XX	<i>XXY,B^s</i>	n	NDJ	% NDJ
ctrl	1138	1137	1	1312	1309	3	2450	4	0,16
CapG	498	382	116	486	474	12	984	128	13,01
Barren	852	778	74	892	871	21	1741	95	5,46

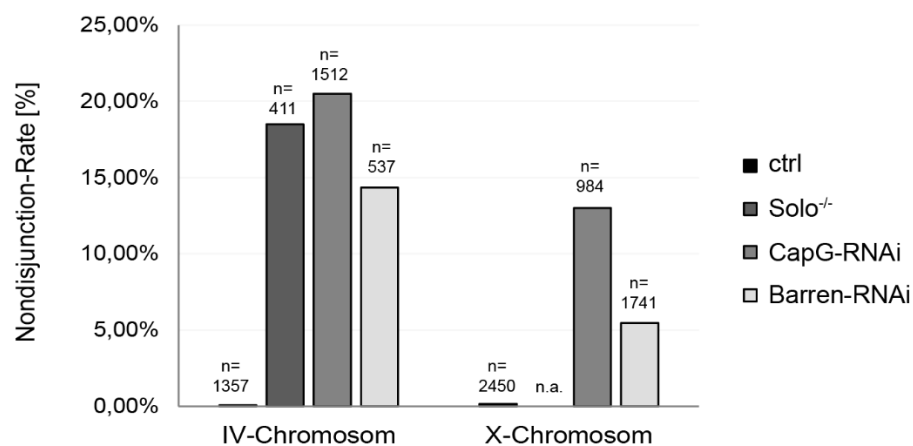


Abbildung 23

Bei „Compound“-Chromosomen handelt es sich um synthetische Chromosomen, welche durch die Fusion zweier homologer Chromosomen, in diesem Fall der beiden IV. Chromosomen, gekennzeichnet sind. Durch chromosomale Umlagerung wurden die homologen Chromosomenarme so manipuliert, dass diese sich ein Centromer teilen und nicht mehr getrennt voneinander segregiert werden können. Über die auf *C(4)RM, ci¹ ey^R* befindliche, rezessive Markermutation *ey^R*, welche sich in Form einer verkleinerten Augenmorphologie mit irregulären Facetten manifestiert, kann eine Aussage über den spezifischen Ploidiegrad des IV. Chromosoms getroffen werden. Die Eizellen derartiger Weibchen verfügen entweder über beide (diplo-IV bzw. *C(4)RM, ci¹ ey^R*) oder über keines des beiden IV. Chromosomen (nullo-IV bzw. 0). Durch Befruchtung solcher Eizellen mit normalen, haploiden Spermien des Männchens treten Nachkommen der Genotypen *0/+* und *C(4)RM, ci¹ ey^R/+* auf (Abb. 23 A). Hingegen können durch eine Befruchtung mit aneuploiden Keimzellen (0 oder ++) vier außerordentliche Genotypen entstehen: *0/0* oder *C(4)RM, ci¹ ey^R/0* oder *0/++* oder *C(4)RM, ci¹ ey^R/++* (Abb. 23 A). Triplo-IV Individuen (*C(4)RM, ci¹ ey^R/+*) sind vital, fertil und unterscheiden sich hinsichtlich der Augenmorphologie aufgrund des wildtypischen Allels von *ey* auf dem paternalen Chromosom nicht von wildtypischen Fliegen. Nullo-IV Individuen (*0/0*) treten unter Nachkommen nicht auf, da das Fehlen beider IV. Chromosomen zu Letalität führt. Tetra-IV (*C(4)RM, ci¹ ey^R/++*) sowie haplo-IV (*0/+*) Fliegen weisen eine sehr geringe Überlebensrate auf und sind unter den Nachkommen stark unterrepräsentiert. Bezüglich des Augenphänotyps sind diese ebenfalls von normalen Nachkommen nicht zu unterscheiden (Harris et al., 2003).

Abbildung 23 | Erhöhte Fehlsegregationsrate von Autosomen und Gonosomen nach Inaktivierung von Condensin I in der männlichen Keimbahn. Für die *Nondisjunction*-Analysen des IV. Chromosoms wurden männliche Individuen der Genotypen *UAS-Barren-RNAi/+; bam-Gal4-VP16/+* oder *+/+; bam-Gal4-VP16/UAS-CapG-RNAi* oder *solo²²⁻⁰¹⁹⁸/solo²²⁻⁰¹⁹⁸* (*solo^{-/-}*) oder *w⁻* (ctrl) mit jungfräulichen Weibchen des Genotyps *C(4)RM, ci¹ ey^R/0 verpaart*. Für die Segregationsanalyse der Geschlechtschromosomen wurden Männchen des Genotyps *X/Dp(1;Y)B⁵Yy⁺; bam-Gal4-VP16/UAS-Condensin-RNAi* mit jungfräulichen, wildtypischen Weibchen verpaart. A) Potentiell erwartete Genotypen sowie Phänotypen der Nachkommenschaft der angegebenen Kreuzungen bei Befruchtung mit haploiden und aneuploiden Spermien. Fliegen der Genotypen *C(4)RM, ci¹ ey^R/++* und *0/+* (eckige Klammern) treten nur selten und erratisch auf und wurden bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt. B) Klassifizierung und Quantifizierung der Nachkommenschaft der angegebenen Kreuzungen. Die Tabelle repräsentiert die absoluten Zahlen nach Auszählung aller Nachkommen. Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil an Nachkommen, welche aus der Befruchtung mit aneuploiden Spermien hervorgegangen sind. Die Genotypen, welche nach Befruchtung mit aneuploiden Spermien entstehen sind jeweils grau hinterlegt.

Als einzige Klasse von *Nondisjunction*-Ereignissen lassen sich *C(4)RM, ci¹ ey^R/O*-Individuen nachweisen, da nur Nachkommen dieses Genotyps aufgrund der Ausprägung der rezessiven Markermutation *ey^R* phänotypisch eindeutig identifiziert werden können. Alle anderen Klassen bleiben unbemerkt, da diese entweder ein wildtypisches Erscheinungsbild aufweisen oder im Fall von *O/O*-Embryonen letal sind (Abb. 23 A). Als Positivkontrolle und um die Funktionalität des Systems zu bestätigen, Fehlsegregationsereignisse während der Spermatogenese nachweisen zu können, wurde die *Nondisjunction*-Rate *solo*-mutanter Individuen bestimmt. SOLO (*sisters on the loose*) wurde erstmals als kohäsives Protein in der männlichen Meiose von *D. melanogaster* identifiziert (Yan et al., 2010). *solo*-mutante Individuen offenbaren einen frühzeitigen Verlust der centromerischen Kohäsion und infolgedessen hohe Frequenzen chromosomaler Fehlsegregationen sowohl in Meiose I als auch Meiose II (Yan et al., 2010). Tatsächlich kann für *Solo*-mutante Männchen eine erhöhte Rate (18,49 %) IV. chromosomaler *Nondisjunction* bestätigt werden. (Abb. 23 B). Nach RNAi-vermittelter Depletion von CapG und Barren treten *ey^R*-Individuen mit einer vergleichbar hohen Häufigkeit von 14,34 % bzw. 20,50 % auf (Abb. 23 B). Da mit dem hier durchgeführten Test nicht alle Klassen von Fehlsegregationsereignissen eindeutig erfasst werden können, repräsentiert der ermittelte Prozentsatz an Fehlsegregationen eine Unterbewertung des realen Wertes. Weil die zweite Klasse an diplo-IV Fliegen (*O/++*), die nach Befruchtung mit aneuploiden Spermien auftreten können, mit statistisch derselben Häufigkeit auftreten sollte, muss davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Rate an *Nondisjunction*-Ereignissen mutmaßlich als doppelt so hoch einzuschätzen ist.

Um neben der autosomalen Segregation eine Aussage über die Segregation der Geschlechtschromosomen in Abhängigkeit von Condensin treffen zu können, wurden transgene Männchen erzeugt, welche neben den beiden Transgenen (*UAS-Condensin-RNAi* und *bam-Gal4-VP16*) für den RNAi-vermittelten Abbau der Condensin-Untereinheiten ein Y-Chromosom tragen, welches die dominante Markermutation *B^S* besitzt. Diese Männchen wurden anschließend mit wildtypischen Weibchen verpaart. Bei *B^S* handelt es sich, ähnlich wie *ey^R*, um eine die Augenmorphologie betreffende Mutation, welche zu einer Reduktion der Ommatidienanzahl führt und die Augen kleiner und nierenförmig erscheinen lässt. Im Falle einer unbeeinträchtigten Segregation der Geschlechtschromosomen würden aus der Kreuzung nur solche Männchen mit reduzierten Augen (*XY, B^S*) und wildtypische Weibchen (*XX*) hervorgehen. Das Auftreten von wildtypischen Männchen (*XO*) oder augenphänotypisch

auffälligen Weibchen (XXY, B^S) würde eine Fehlsegregation der Geschlechtschromosomen während der männlichen Meiose indizieren. Tatsächlich lässt sich nach RNAi-vermittelter Depletion von CapG und Barren eine signifikant erhöhte Rate (13,01 % bzw. 5,41 %) an *Nondisjunction*-Ereignissen des XY-Paares nachweisen (Abb. 23 B). Eine detaillierte Betrachtung der Nachkommen lässt außerdem Rückschlüsse darüber zu, ob durch Depletion von Condensin I die Homologen- oder die Schwesterchromatidtrennung präferentiell betroffen ist. Aneuploide XY-Spermien können ausschließlich durch *Nondisjunction*-Ereignisse in Meiose I entstehen. Das Auftreten von Nachkommen des Genotyps XXY, B^S bestätigt somit eine fehlerhafte Trennung der homologen Chromosomen nach Depletion von Condensin I. Falls Fehlsegregation nur in Meiose I auftritt, sollten nullo-Spermien erwartungsgemäß mit der gleichen Häufigkeit entstehen wie XY-Spermien. Da jedoch solche Nachkommen, die auf eine Befruchtung mit nullo-Spermien zurückgehen (XO), um ein Vielfaches häufiger auftreten (Abb. 23 B), kann davon ausgegangen werden, dass die Inaktivierung von Condensin I zu Fehlsegregation sowohl während der ersten als auch der zweiten meiotischen Teilung führt.

Über die chromosomale Fehlsegregation in Anhängigkeit von SMC2 kann im Rahmen der durchgeführten Tests keine Aussage getroffen werden, da aufgrund der durch den SMC2 *knockdown* hervorgerufenen Sterilität keine vergleichbaren Analysen durchgeführt werden können. Die *Nondisjunction*-Analysen für die Depletion von CapG und Barren belegen jedoch, dass die durch Condensin-Inaktivierung in Meiose hervorgerufenen Defekte eine nachweisliche Fehlsegregation von Autosomen sowie Gonosomen nach sich ziehen und infolgedessen aneuploide Keimzellen gebildet werden.

Um das Auftreten aneuploider Spermienkerne cytogenetisch verifizieren zu können, wurden die Chromosomen immunfluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Durch Quantifizierung der Chromosomenanzahl pro Spermienkern können Abweichungen von der normalen Chromosomenanzahl unmittelbar erfasst werden. Die Visualisierung der Chromosomen erfolgte zunächst durch spezifische Färbung des Proteins Cid (*centromere identifier*), welches präferentiell in der centromerischen Chromatinregion lokalisiert. Cid repräsentiert eine Centromer-spezifische Variante Histon H3-ähnlicher Proteine und bildet das *D. melanogaster* Homolog zum Cenp-A Protein der Vertebraten (Henikoff et al., 2000).

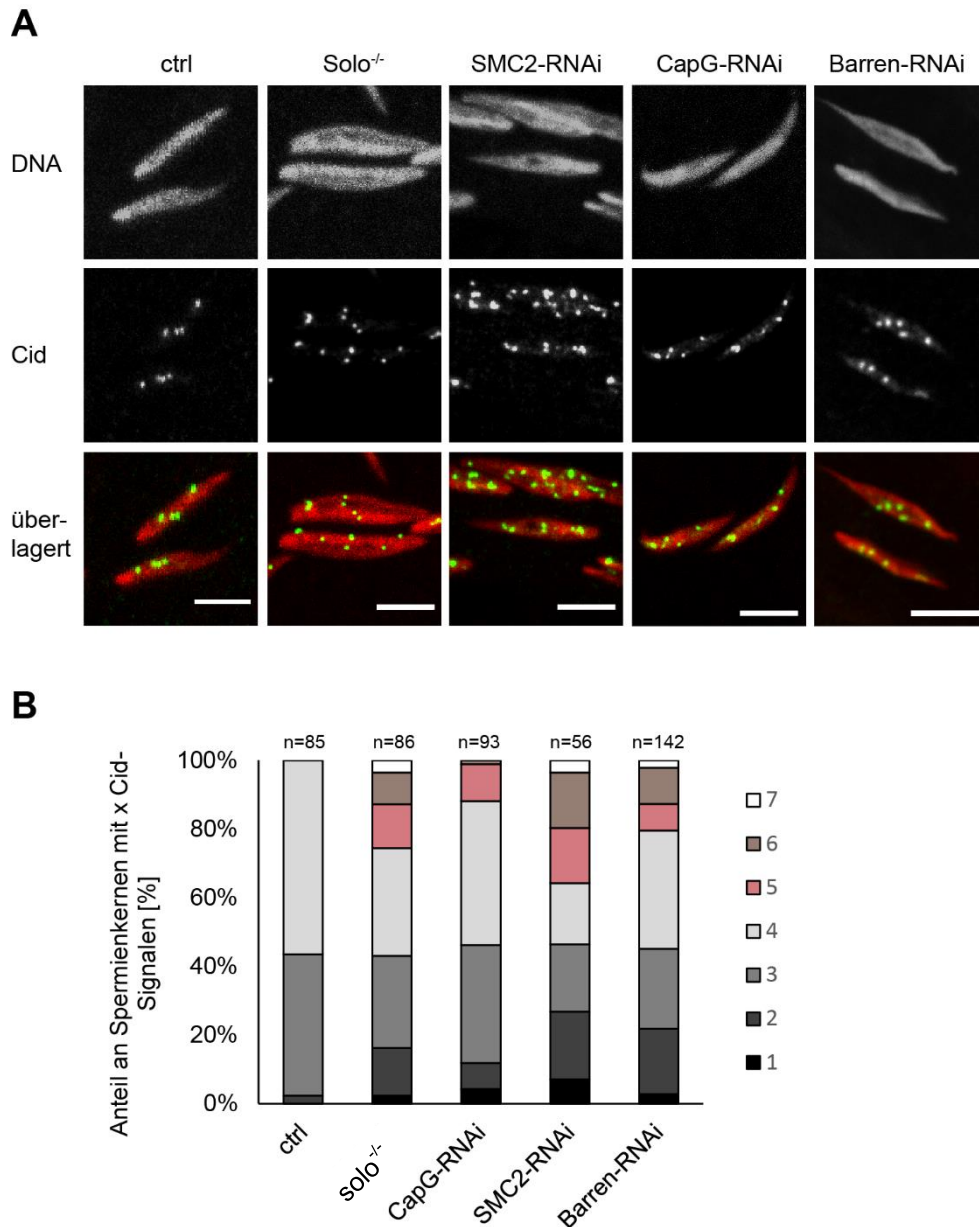


Abbildung 24 | Abnormale Anzahl an Cid/CenH3-Foci in Spermienkernen nach RNAi-vermittelter Depletion einzelner Condensin-Untereinheiten in der männlichen Keimbahn. A) Immunhistologische Färbung an Quetschpräparaten von adulten Testes nach *bam-Gal4-VP16*-abhängiger Expression Condensin-spezifischer siRNAs. Als Kontrolle wurden Individuen der Genotypen *bam-Gal4-VP16* (ctrl) und *solo*^{Z2-0198}/*solo*^{Z2-0198} (*solo*^{-/-}) untersucht. Die Färbung von Cid erfolgte durch einen gegen Cid gerichteten Antikörper (grün), die Färbung der DNA mit Hoechst 33258 (rot). Es sind repräsentative Aufnahmen einzelner Spermienkerne gezeigt, die eine abweichende Anzahl an Cid/CenH3-Signalen aufweisen. Maßstab: 5 µm B) Quantifizierung der Anzahl an Cid Signalen pro Spermienkern. Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil von Spermienkernen mit 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7 Cid/CenH3-Signalen an allen untersuchten Spermienkernen.

Aufgrund ihres haploiden, insgesamt vier Chromosomen umfassenden, Chromosomensatzes sollten pro Spermienkern erwartungsgemäß vier Signale für Cid/CenH3 detektiert werden können. Tatsächlich können in den Nuklei wildtypischer Individuen maximal drei bis vier Cid/CenH3-Signale nachgewiesen werden (Abb. 24). Das Auftreten von drei anstelle von vier erwarteten Signalen ist vermutlich durch ein zufälliges Clustering der Centromere bedingt, sodass diese nicht mehr als einzelne Signale aufgelöst werden können. Nach RNAi-vermitteltem Abbau der Condensin-spezifischen Untereinheiten SMC2, CapG und Barren tritt ein erhöhter Anteil an Keimzellen mit mehr als vier oder weniger als drei Cid/CenH3-Signalen auf (Abb. 24), was auf einen abnormalen Karyotyp dieser Kerne hindeutet.

Schließlich wurde die chromosomale Fehlverteilung gezielt im Fall eines individuellen Chromosoms betrachtet (Abb. 25). Mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) kann die Anwesenheit individueller Chromosomen diagnostiziert werden. FISH basiert auf der Visualisierung chromosomenspezifischer Sequenzbereiche durch Hybridisierung mit Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden. Für den sequenzspezifischen Nachweis des X-Chromosoms wurde eine DNA-Sonde herangezogen, welche in 359 bp repetitiven, centromernahen DNA-Regionen des X-Chromosoms bindet. Es wurden Quetschpräparate von Hoden adulter Männchen erzeugt und die DNA nach Denaturierung mit der X-chromosomalen Sonde hybridisiert. Bei einer akkuraten Segregation der Geschlechtschromosomen im Verlauf der Meiose werden Gameten gebildet, welche eine singuläre Kopie jeweils eines der beiden Gonosomen (X oder Y) tragen. Erwartungsgemäß kann unter normalen Bedingungen in 50 % der Spermatidenkerne ein X-Chromosom-spezifisches Signal nachgewiesen werden (Abb. 25). Nach RNAi-vermittelter Degradation von SMC2, CapG und Barren hingegen verschiebt sich dieses Verhältnis zugunsten von Kernen, die mehr als ein X-Chromosom enthalten. Kerne mit zwei X-chromosomalen Signalen können mit einer Häufigkeit von 7,4 % (SMC2-RNAi), 2,6 % (CapG-RNAi) und 8,2 % (Barren-RNAi) identifiziert werden. Das Auftreten von zwei X-chromosomalen Signalen pro Kern im Fall des RNAi-vermittelten Abbaus einzelner Condensin-Untereinheiten weist erneut auf eine fehlerhafte Trennung der Geschlechtschromosomen hin. Der Nachweis einer abnormalen Zahl an Cid/CenH3-Signalen sowie die Beobachtung überzähliger X-Chromosomen bestätigen den Anstieg der Aneuploidiefrequenz nach Inaktivierung des Condensin I-Komplexes in der männlichen Keimbahn. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *Nondisjunction*-

Analysen unterstreichen diese Daten eine essentielle Funktion des Condensin I-Komplexes bei der meiotischen Chromosomensegregation.

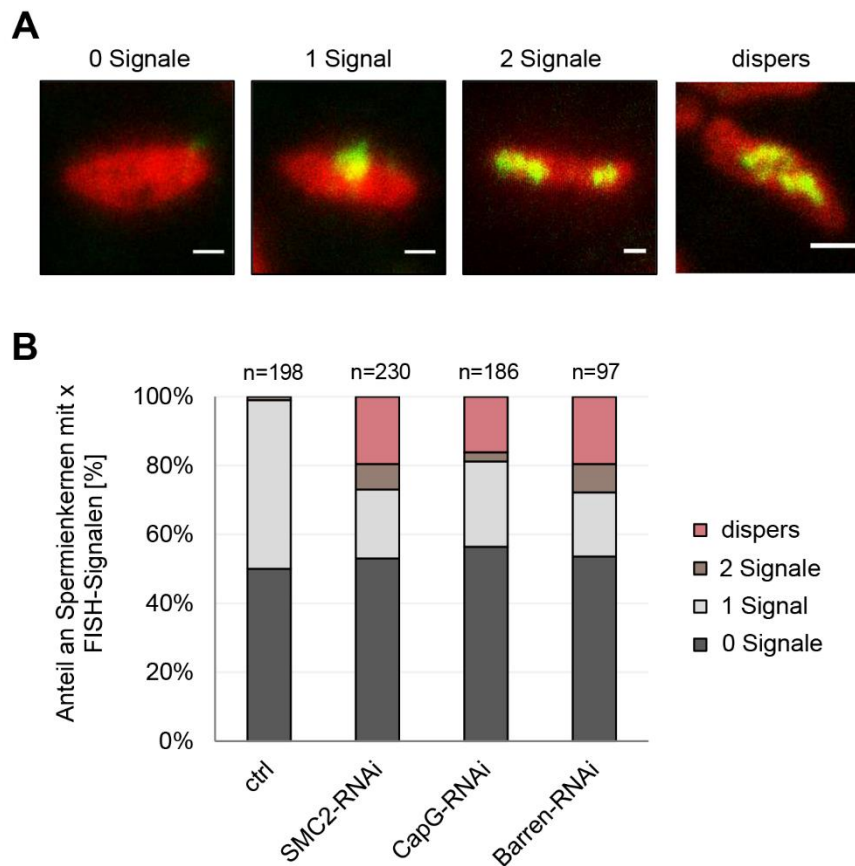


Abbildung 25 | Chromosomale *Nondisjunction* nach Condensin Depletion führt zu einer abnormalen Anzahl an X-Chromosomen in Spermienkernen. FISH an Quetschpräparaten von adulten Testes nach *bam-Gal4-VP16*-abhängiger Expression Condensin-spezifischer siRNAs. Als Kontrolle wurden Individuen des Genotyps *bam-Gal4-VP16* (ctrl) untersucht. A) Repräsentative Aufnahmen von Spermatidenkernen mit 0, 1, 2 bzw. dispersen FISH-Signalen. Der Nachweis des X-Chromosoms erfolgte durch Hybridisierung mit einer gegen X-chromosomale Sequenzen gerichteten DNA-Sonde (grün). Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt (rot). Maßstab: 2 μ m B) Quantifizierung von Spermatidenkernen mit 0, 1, 2 oder dispersen FISH-Signalen. Die Balken repräsentieren den jeweiligen prozentualen Anteil an der Gesamtzahl aller untersuchten Spermatidenkerne pro Genotyp.

Auffällig ist zudem, dass ein maßgeblicher Anteil an Spermatidenkernen eine nicht uniformes, sondern zerstreutes und dispers erscheinendes FISH-Signal aufweist (Abb. 25). In diesen Fällen konnte keine zuverlässige Aussage über die exakte Anzahl an X-Chromosomen getroffen werden. Die Frage nach der Ursache für die Zerstreuung des Signals konnte jedoch

im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Auf Basis der Chromatinstrukturierenden Funktion der Condensin-Komplexe könnte ein beeinträchtigter Kondensationsstatus des Spermatidenchromatins als potentielle Ursache in Betracht gezogen werden.

2.3.5 Die Inaktivierung von Condensin I beeinträchtigt die Morphologie von Spermienkernen

Neben den nachweislichen Chromosomenanomalien lassen die Spermatidenkerne nach *knockdown* von SMC2, CapG und Barren morphologische Auffälligkeiten erkennen. Unmittelbar nach Beendigung des meiotischen Programmes treten die gebündelten Spermatidenkerne in den postmeiotischen Differenzierungsprozess ein, in dessen Verlauf drastische Umformungen des Chromatins sowie der Kernform stattfinden. Durch sukzessive Restrukturierungen wird die rundliche Gestalt der Spermatidenkerne zu der für Spermien charakteristischen nadelförmige Struktur elongiert. Zwischenzeitlich können die Spermatidenkerne als schmale, einer Kanu-Form ähnelnden, Form erkannt werden. Als Bestandteil eines funktionellen Syncytiums durchlaufen die insgesamt 64 Kerne alle Differenzierungsprozesse in synchroner Weise. Anders als im wildtypischen Fall, weisen die Spermatidenkerne nach *knockdown* einzelner Condensin-Untereinheiten keine einheitliche Morphologie auf, sondern variieren in Form und Größe (Abb. 26). Unter den Spermatidenkernen können drei vorherrschende Phänotypen charakterisiert werden: Kerne, die größer bzw. kleiner als die wildtypischen Spermatiden erscheinen, Kerne, welche nicht das typische, längliche Aussehen, sondern eine inhomogene Gestalt offenbaren sowie Kerne, bei denen zwei individuelle DNA-Massen augenscheinlich über feine Chromatinbrücken miteinander fusioniert sind (Abb. 26). Die enorme Heterogenität jedoch erschwert in den meisten Fällen eine eindeutige Zuordnung zu einem der beschriebenen Phänotypen, wodurch eine Quantifizierung nicht sinnvoll erschien. Über den Hintergrund der unregelmäßigen Kernmorphologie kann auf Basis der zur Verfügung stehenden Daten nur spekuliert werden. Während eine abnormale Größe sich auf einen veränderten DNA-Gehalt aneuploider Kerne zurückführen ließe, könnten augenscheinlich „zusammenhängende“ DNA-Massen das Resultat einer unvollständigen Segregation in Meiose sein. Die inhomogene Gestalt der Spermatiden-Nuklei wiederum könnte mit einer beeinträchtigten Chromatinorganisation in Folge der Condensin-Depletion in Zusammenhang gebracht

werden. Dies wäre konsistent mit dem oben gezeigten Phänotyp, wonach die Hybridisierung mit einer centromernahen DNA-Sonde des X-Chromosoms uneinheitliche, disperse Signale liefert (Abb. 25).

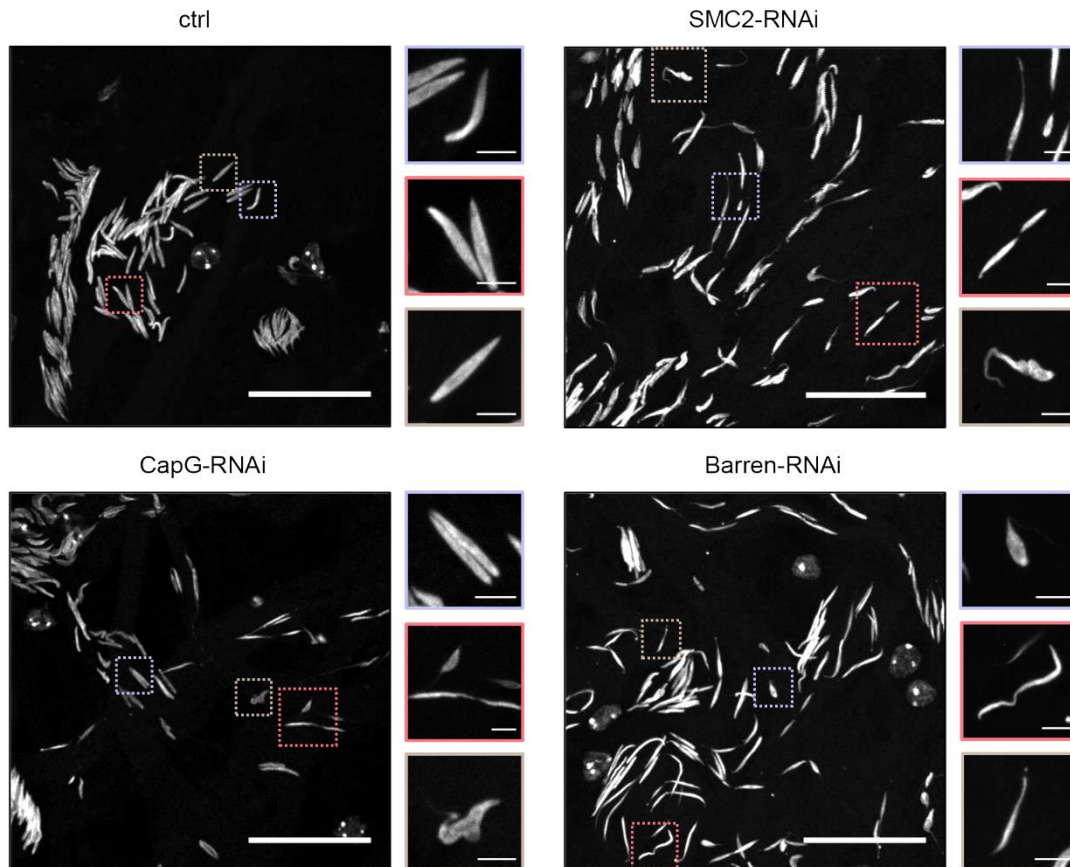


Abbildung 26 | Morphologie von Spermatidenkernen nach Depletion einzelner Condensin-Untereinheiten. Repräsentative Aufnahmen von Spermatidenkernen nach *knockdown* von Condensin-Untereinheiten in der männlichen Keimbahn. Hoden aus adulten Männchen der Genotypen *+/+*; *bam-Gal4-VP16/UAS-SMC2-RNAi* oder *+/+*; *bam-Gal4-VP16/UAS-CapG-RNAi* oder *UAS-Barren-RNAi/+*; *bam-Gal4-VP16/+* oder *bam-Gal4-VP16* (ctrl) wurden präpariert und Quetschpräparate angefertigt. Die Färbung der DNA erfolgte mit Hoechst 33258. Maßstab: 50 µm (Übersicht) bzw. 5 µm (Vergrößerung)

2.3.6 Die Inaktivierung von Condensin I hat einen frühzeitigen Zerfall der gebündelten Spermatiden während der Spermiogenese zur Folge

Neben den nachweislichen Defekten bei der Chromosomensegregation scheint die Inaktivierung von Condensin I auch die Spermiogenese negativ zu beeinflussen. Die im Verlauf der Meiose gebildeten, haploiden Spermatiden bleiben über den gesamten Zeitraum

der postmeiotischen Differenzierungsphase durch Cytoplasmabrücken in Bündeln zu je 64 Kernen fusioniert, welche im terminalen Drittel des Hodens akkumulieren. Erst nach deren vollständiger Differenzierung werden diese in einem Apoptose-ähnlichen Prozess individualisiert. Nach Depletion von SMC2, CapG und Barren jedoch ist die Integrität der Spermatidenbündel nachweislich beeinträchtigt (Abb. 27). Dies wird besonders dadurch deutlich, dass die Bündel aus weit weniger als 64 Nuclei bestehen. Stattdessen sind die Hoden in ihrer gesamten Dimension mit einzelnen, bereits individualisierten Spermienkernen angereichert. Ob es sich bei dem vorzeitigen Zerfall der Spermatidenbündel um einen direkten Effekt der Condensin-Inaktivierung handelt, oder ob dieser lediglich einen Sekundäreffekt der beeinträchtigten Spermatogenese darstellt, kann anhand der durchgeführten Experimente bislang nicht eindeutig beantwortet werden.

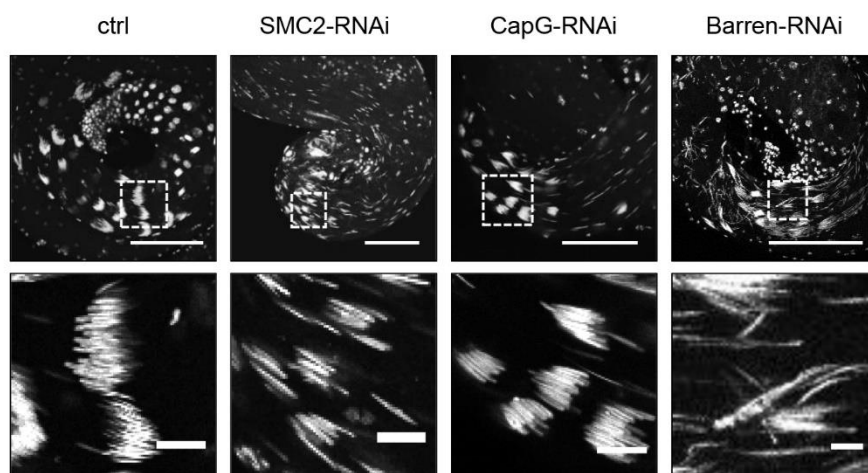


Abb. 27 | Vorzeitiger Zerfall gebündelter Spermatidenkerne nach keimbahnspezifischer Depletion von SMC2, CapG und Barren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Spermatidenbündeln aus adulten Hoden der Genotypen *+/+; bam-Gal4-VP16/UAS-SMC2-RNAi* oder *+/+; bam-Gal4-VP16/UAS-CapG-RNAi* oder *UAS-Barren-RNAi/+; bam-Gal4-VP16/+* sowie *bam-Gal4-VP16* (ctrl). Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt. Maßstab: 50 µm (Übersicht) bzw. 5 µm (Vergrößerung)

2.3.7 Proteolytische Spaltung der Condensin I-Untereinheit Barren während der Spermatogenese in *D. melanogaster*

Das grundlegende Prinzip der RNAi ist die Manipulation der Genexpression durch Regulation des mRNA-Levels. Derartige Methoden wirken folglich bereits *upstream* des Proteinlevels. Eine effiziente Depletion der Zielproteine erfordert deshalb eine möglichst hohe Umsatzrate

der Zielproteine. Aus diesem Grund war es wünschenswert eine Methode anzuwenden, mit der Proteine direkt auf posttranslationaler Ebene inaktiviert werden können. Als nützliche Strategie erweist sich das TEV-Protease System, welches eine konditionale Suppression der Condensin Funktion auch in lebenden Fliegen ermöglicht. Die Funktionalität des TEV-Systems für eine robuste Inaktivierung der Condensin-Komplexe wurde bereits in verschiedenen Modellsystemen erfolgreich verifiziert (Cuylen et al., 2011; Houlard et al., 2015; Piskadlo et al., 2017). Das TEV-Protease System basiert auf der artifiziellen Spaltung designierter Proteine durch die exogene Protease TEV (*Tobacco Etch Virus*). Durch die Gal4/UAS-abhängige Expression der TEV-Protease kann der proteolytische Abbau ebenfalls zeit- bzw. gewebespezifisch reguliert werden. Um das TEV-Protease System für die Inaktivierung von Condensin I zu nutzen, wurden transgene Fliegenlinien generiert, welche modifizierte Condensin-Komplexe exprimieren, die sensitiv gegenüber TEV-Protease sind und proteolytisch inaktiviert werden können. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Varianten der Kleisin-Untereinheit Barren erzeugt, welche durch drei konsekutive TEV-Schnittstellen an unterschiedlichen Aminosäurepositionen (TEV¹⁵⁶ bzw. TEV⁵⁹¹) in der zentralen Proteinregion gekennzeichnet sind (Abb. 28 A). Die Auswahl der Aminosäurepositionen für die Integration der TEV-Zielsequenzen erfolgte nach diversen Kriterien: Um die Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die TEV-Protease zu gewährleisten, muss zum einen die Oberflächenexponiertheit der zutreffenden Bereiche gegeben sein. Zum anderen wurden die Positionen dahingehend ausgewählt, dass diese weder innerhalb vorhergesagter Protein-Interaktionsflächen noch in stark konservierten Sequenzbereichen liegen, um zu verhindern, dass wichtige für die Funktionalität des Proteins erforderliche Sequenzmotive beeinträchtigt werden. Beide modifizierte Proteinvarianten (Barren-TEV¹⁵⁶ und Barren-TEV⁵⁹¹) scheinen voll funktionell zu sein, da diese die Letalität im Barren depletierten Hintergrund komplementieren (Daten nicht gezeigt). Die Inaktivierung von Condensin I in der männlichen Keimbahn erfolgte durch *bam-Gal4-VP16* vermittelte Expression von TEV-Protease im *Barren*-mutanten Hintergrund. Zunächst wurde überprüft, ob die TEV-Protease-Expression eine effiziente Spaltung der Barren Varianten *in vivo* induziert. Western Blot Analysen zeigen, dass beide Proteine nach Expression von TEV ektopisch gespalten werden, was durch das Auftreten einer zusätzlichen, mit einem der beiden Spaltprodukte korrelierenden, Bande indiziert wird (Abb. 28 B).

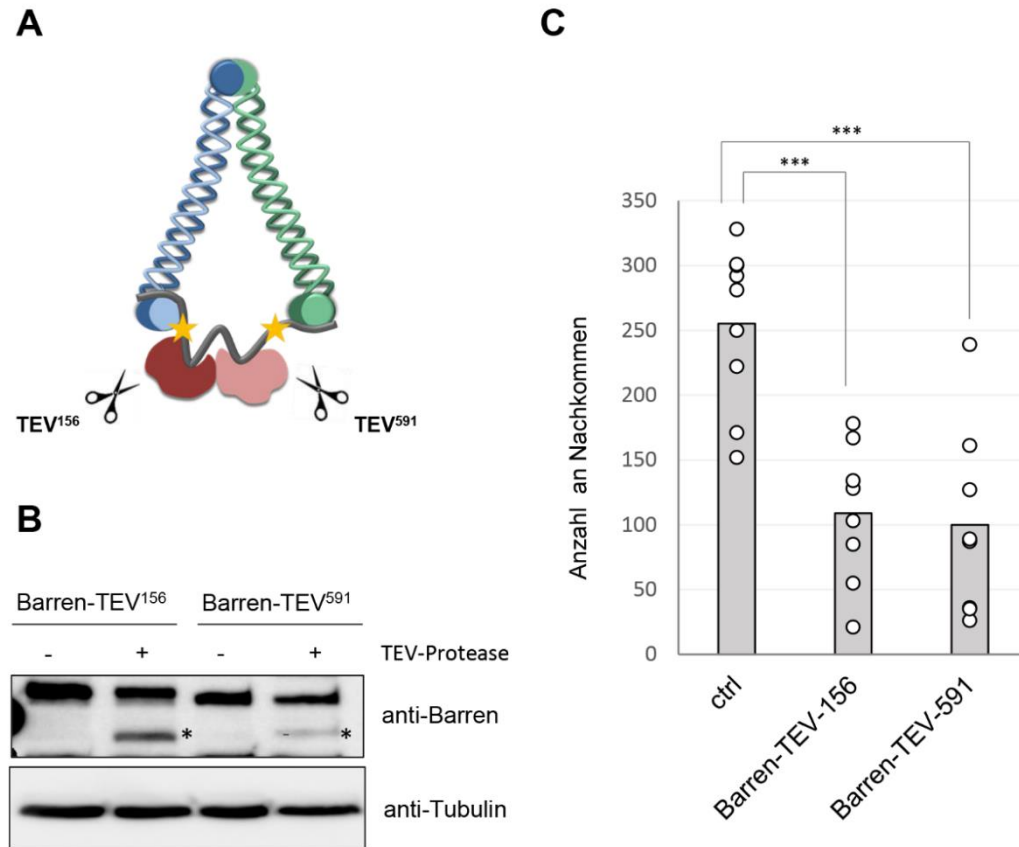


Abbildung 28 | TEV-Protease-vermittelte Spaltung der Condensin-Untereinheit Barren in der Keimbahn von *D. melanogaster* führt zu einer Reduktion der männlichen Fertilität. A) Schematische Darstellung des Condensin I-Komplexes mit artifiziiellen TEV-Protease Schnittstellen (Stern). Drei konsequente TEV-Schnittstellen sind an den Aminosäurepositionen 156 bzw. 591 der Kleisin-Untereinheit Barren integriert. B) Spaltung der modifizierten Barren-Varianten nach Expression von TEV-Protease in der männlichen Keimbahn *in vivo*. Proteinextrakte aus adulten Testes der Genotypen *Df(2L)Exel7077, UASP-TEV^{SV} Il.1/barr^{L305}; bam-Gal4-VP16/Barren-TEV (+)* und *Df(2L)Exel7077, UASP-TEV^{SV} Il.1/barr^{L305}; +/Barren-TEV (-)* wurden im Western Blot analysiert. Es wurden jeweils 10 adulte Hoden pro Bahn geladen. Die Detektion der Volllängen-Proteine sowie Spaltprodukte (*) erfolgte durch einen Barren-spezifischen Antikörper. α -Tubulin-Proteinlevel wurden als Ladekontrolle dokumentiert C) Quantifizierung der Nachkommenschaft aus einer Kreuzung wildtypischer Weibchen mit Männchen nach TEV-induzierter Spaltung von Barren (*Df(2L)Exel7077, UASP-TEV^{SV} Il.1/barr^{L305}; bam-Gal4-VP16/Barren-TEV*). Als Kontrolle (ctrl) wurden wildtypische Männchen (*w*) analysiert. Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel aus der Nachkommenschaft von acht einzelnen Männchen des jeweiligen Genotyps. Die statistische Auswertung erfolgte durch *unpaired student's t-test* (***) $p < 0,001$.

Die TEV-Protease vermittelte Proteolyse verursacht die Spaltung von Barren in zwei Proteinfragmente. Da die TEV-Schnittstellen beider Barren-Varianten in ähnlichem Abstand zum C- bzw. N-terminalen Ende des Proteins integriert sind, weisen die entstehenden Spaltfragmente eine vergleichbare Größe auf (Barren-TEV¹⁵⁶: 17,6 kDa und 65,2 kDa; Barren-TEV⁵⁹¹: 66,7 kDa und 16,1 kDa). Da das kleinere der beiden Spaltprodukte nicht von dem gegen Barren gerichteten Antikörper erkannt wird, kann lediglich das größere Fragment

detektiert werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass in beiden Fällen keine vollständige Spaltung von Barren erzielt werden kann. Dies wird besonders dadurch deutlich, dass das Proteinlevel von ungespaltenem Barren-Protein im Western Blot nicht sichtbar verringert wird. Trotz der limitierten Spalteffizienz wurden die betreffenden männlichen Individuen auf ihre Fertilität hin untersucht. Tatsächlich hat die proteolytische Spaltung von Condensin I während der frühen spermatogonialen und meiotischen Teilungen eine signifikante Reduktion der Nachkommenschaft zur Folge (Abb. 28 C). Das Ausmaß der Fertilitätsminderung scheint dabei unabhängig von der Position der proteolytischen Spaltung zu sein. Die Spaltung beider Varianten (Barren-TEV¹⁵⁶ und Barren-TEV⁵⁹¹) führt zu einer vergleichbaren Reduktion der Nachkommenschaft bis auf 43 % bzw. 39 %. Folglich kann durch die artifizielle Spaltung von Barren der Phänotyp nach RNAi-vermittelter Depletion einzelner Condensin-Untereinheiten reproduziert werden. Allerdings ist der hier beobachtete Effekt auf die Fertilität hinsichtlich dessen Intensität eher unerwartet, berücksichtigt man die geringe Spalteffizienz in den Western Blot Analysen. Unter der Annahme, dass ein Großteil der Condensin-Komplexe nicht von der proteolytischen Spaltung durch TEV-Protease erfasst wird, wäre ein milderer Phänotyp auf die männliche Fertilität zu erwarten gewesen.

2.3.8 Proteasomaler Abbau von Barren bestätigt den Einfluss von Condensin I auf die meiotische Chromosomensegregation und männliche Fertilität

Zwar ist der durch TEV-Protease Spaltung verursachte Phänotyp konsistent mit denjenigen Effekten, die nach RNAi-vermitteltem Abbau beobachtet werden können, jedoch kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass dieser auf dominant-negative Effekte der entstehenden Spaltprodukte zurückzuführen ist. Um eine Fehlinterpretation der resultierenden Daten auf ein Minimum zu reduzieren, wurde das DeGradFP-System als dritte Methode verwendet, um die Funktion von Condensin konditional zu inhibieren. Das DeGradFP-System beruht auf dem zielgerichteten, proteasomalen Abbau EGFP-markierter Fusionsproteine. Die Proteasom-abhängige Degradation ist ein zentraler und universeller Mechanismus für den selektiven Proteinkatabolismus in Eukaryonten und erfordert die Ubiquitinierung designierter Proteine durch Ubiquitin-konjugierende Enzyme, wie den SCF-Komplex (Cardozo and Pagano, 2004). Bei diesem handelt es sich um eine Multi-Protein E3-

Ubiquitin-Ligase bestehend aus den drei Kernkomponenten Skp1, Cullin und F-Box-Protein (Cardozo and Pagano, 2004). F-Box-Proteine sind durch divergente Protein-Protein-Interaktionsmotive gekennzeichnet und infolgedessen für die Erkennung von Zielproteinen sowie die Substratspezifität des SCF-Komplexes verantwortlich (Skowyra et al., 1997). Das DeGradFP-System nutzt eine modifizierte Variante (NSlmb-vhh-GFP) des *D. melanogaster* F-Box-Proteins Slmb, welches durch die direkte Fusion der N-terminalen F-Box-Domäne von Slmb mit einem gegen EGFP gerichteten *single domain* Antikörperfragment erzeugt wurde (Caussinus et al., 2011). Durch die spezifische Erkennung EGFP-markierter Proteine können diese gezielt dem zellulären, Ubiquitin-abhängigen Abbauweg zugeführt werden (Abb. 29 A).

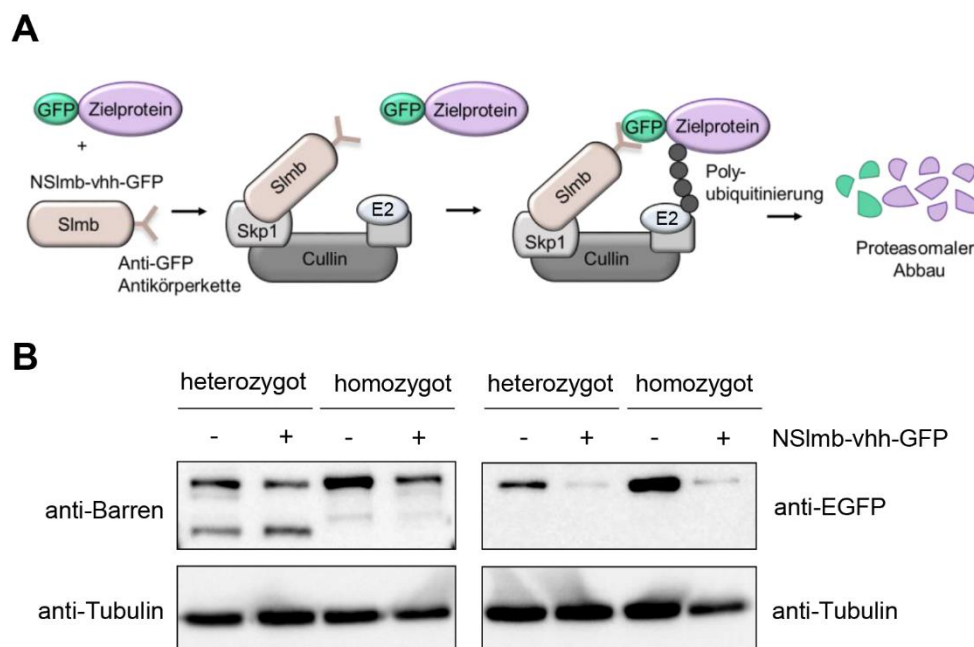


Abbildung 29 | DeGradFP-vermittelter Abbau von Barren in der männlichen Keimbahn von *D. melanogaster*

A) Schematische Repräsentation der Funktionsweise des DeGradFP-Systems. Der SCF-Komplex, bestehend aus den Kernuntereinheiten Skp1, Cullin und F-Box-Protein (Slmb) sowie weiteren Untereinheiten katalysiert die kovalente Verknüpfung von Zielproteinen mit Ubiquitin-Molekülen. Die Substratspezifität für EGFP-markierte Fusionsproteine wird durch eine modifizierte Variante (NSlmb-vhh-GFP) des F-Box-Proteins gewährleistet, welches eine Fusion der N-terminalen Domäne von Slmb und der Antigen-bindenden Domäne eines GFP-Antikörpers darstellt. Ubiquitinierte Proteine werden schließlich proteasomal abgebaut. B) Immunologischer Nachweis der Abbaueffizienz von Barren-FE in der männlichen Keimbahn von *D. melanogaster*. Western Blot von Proteinextrakten aus adulten des Testes der Genotypen *Barren-FE/Barren-FE* oder *CyO; bam-Gal4-VP16/UASP-NSlmb III.1 (+)* bzw. *Barren-FE/Barren-FE* oder *CyO; bam-Gal4-VP16/TM3,Sb (-)*. Es wurden jeweils 10 Hoden pro Bahn geladen. Die Detektion von Barren und Barren-FE erfolgte durch Barren- sowie EGFP-spezifische Antikörper. Der Nachweis der Tubulin-Proteinlevel erfolgte durch α -Tubulin-spezifische Antikörper als Ladekontrolle.

Durch *bam-Gal4-VP16* vermittelte Expression von Nslmb-vhh-GFP wird die EGFP-markierte Condensin I-Untereinheit Barren-FE keimbahnspezifisch abgebaut. Um eine vollständige Degradation des gesamten verfügbaren Barren-Proteins zu erzielen, wurden Fliegen verwendet, welche homozygot für die EGFP-markierte Form von Barren (Barren-FE) sind und kein endogenes *Barren*-Allel mehr tragen. Um eine Aussage über die Spezifität des verwendeten Systems treffen zu können, wurden die Proteinlevel endogenen Barrens in heterozygoten Fliegen vergleichend analysiert (Abb. 29 B). Während Barren-FE merklich abgereichert wird, bleibt die Proteinmenge von endogenem Barren auch nach Expression von Nslmb-vhh-GFP unverändert. Die selektive Depletion von Barren-FE spricht für die Spezifität des Systems für die EGFP-markierte Proteinvariante. Bei der Präparation der Proteinextrakte für den Western Blot konnte ein erster offensichtlicher Phänotyp registriert werden. Im homozygoten Zustand (*Barren-FE/Barren-FE; bam-Gal4-VP16/UASP-Nslmb III.1*) führt der Abbau von Barren-FE zu einem veränderten Erscheinungsbild der adulten Testes. Diese sind sehr viel kleiner im Vergleich zu denjenigen aus Kontrollindividuen oder im heterozygoten Zustand, was bereits auf eine verminderte Proliferationsrate der spermatogonialen Teilungen zurückzuführen ist.

Der Fertilitätstest zeigt, dass der proteasomale Abbau von Barren in der männlichen Keimbahn die Fertilität der betreffenden Individuen herabsetzt. Männchen, welche Nslmb-vhh-GFP exprimieren können durchschnittlich nur etwa halb so viele (54 %) Nachkommen zeugen wie entsprechende Kontrollmännchen ohne Expression von Nslmb-vhh-GFP (Abb. 30 A). Obwohl die statistische Auswertung suggeriert, dass es sich um eine nicht signifikante Abnahme der Fertilität handelt, ist eine deutliche Tendenz dennoch erkennbar. Die enorme Varianz der Kreuzungsansätze innerhalb eines Genotyps kann entweder auf eine schwankende Expression von Nslmb-vhh-GFP oder eine unterschiedliche Fitness der verpaarten Fliegen zurückgeführt werden. Um eine Aussage über die Funktionalität der meiotischen Chromosomensegregation treffen zu können, wurden einzelne Anaphase I-Figuren immunfluoreszenzmikroskopisch betrachtet (Abb. 30 B). Analog zur RNAi-vermittelten Depletion von Barren können Chromatinbrücken zwischen den segregierenden Chromosomen beobachtet werden, welche eine fehlerfreie Trennung inhibieren.

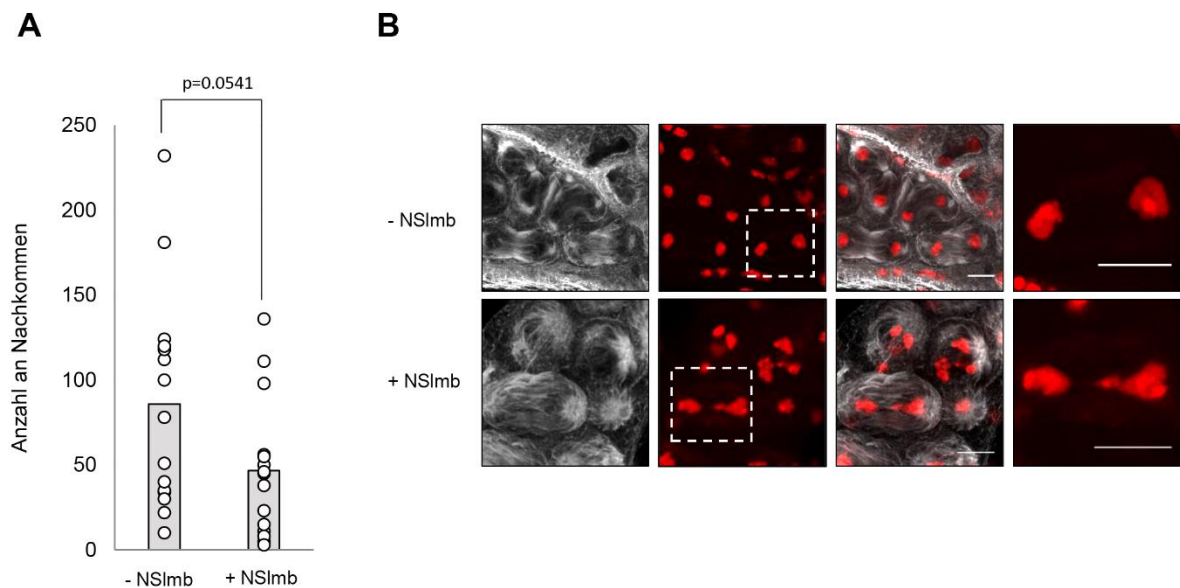


Abbildung 30 | Der proteasomale Abbau von Barren in der männlichen Keimbahn führt zu einer aberranten meiotischen Chromosomensegregation und einer verminderten Fertilität. A) Quantifizierung der Nachkommenschaft aus einer Kreuzung wildtypischer Weibchen (w) mit Männchen der Genotypen *Barren-FE/Barren-FE; UASP-NSImb-vhh-GFP/bam-Gal4-VP16* (+ NSImb) und *Barren-FE/Barren-FE, bam-Gal4-VP16/TM3, Sb* (- NSImb). Die Balken repräsentieren das arithmetische Mittel aus der Nachkommenschaft von 18 einzelnen Männchen des jeweiligen Genotyps. Die statistische Auswertung erfolgte durch *unpaired student's t-test* (* $p=0,0541$). B) Immunfluoreszenzmikroskopische Betrachtung einzelner Anaphase I-Figuren. Hoden aus adulten Männchen der Genotypen *Barren-FE/Barren-FE; UASP-NSImb-vhh-GFP/bam-Gal4-VP16* (+ NSImb) und *Barren-FE/Barren-FE, bam-Gal4-VP16/TM3, Sb* (- NSImb) wurden präpariert, fixiert und immunhistologisch gefärbt. Die Färbung von Tubulin erfolgte mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper (weiß). Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt (rot). Maßstab: 10 μ m

Anhand drei unabhängiger Inaktivierungsstrategien konnte damit ein Einfluss der Condensin-Inaktivierung auf die männliche Fertilität bestätigt werden. Die vorliegende Arbeit demonstriert somit erstmals eine essentielle Funktion des kanonischen Condensin I-Komplexes bei der männlichen Keimzellbildung in *D. melanogaster*. Die Funktion von Condensin I scheint dabei primär für einen korrekten Ablauf der meiotischen Chromosomensegregation erforderlich zu sein. Eine aberrante Segregation der Chromosomen in Meiose I und Meiose II nach Inaktivierung von Condensin führt zur Entstehung aneuploider Keimzellen und schädlichen Erbgutveränderungen der nachfolgenden Generation. Dies unterstreicht zudem die enorme Relevanz des Condensin I-Komplexes für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität.

3 Diskussion

Die beiden hoch konservierten, heteropentameren SMC-Komplexe, Condensin I und Condensin II, spielen tragende Rollen bei der funktionellen und strukturellen Organisation des Chromatins in allen Phasen des Zellzyklus (Hirano, 2012). Ihre prominenteste Funktion liegt in der Etablierung und Erhaltung der Chromatinstruktur in Mitose und Meiose. Die Integrität mitotischer sowie meiotischer Chromosomen ist unabdingbar für deren fehlerfreie Segregation in beiden Prozessen. Eine aberrante Chromosomensegregation kann zu DNA-Schäden und genetischer Instabilität führen – Hauptursachen für die Entstehung von Krebs. Die funktionelle Relevanz beider Condensin-Komplexe für die mitotische und meiotische Chromosomensegregation ist in allen bedeutsamen Modellorganismen, darunter *D. melanogaster*, beschrieben (zur Übersicht siehe Hirano, 2012).

Die ordnungsgemäße Assemblierung und Distribution mitotischer Chromosomen in *D. melanogaster* erfordert die Funktionalität des Condensin I-Komplexes (Bhat et al., 1996; Dej et al., 2004; Savvidou et al., 2005; Steffensen et al., 2001), während der putative Condensin II-Komplex für die mitotische Proliferation in diesem Organismus eine untergeordnete, nicht-essentielle Funktion zu erfüllen scheint (Savvidou et al., 2005). Im Gegensatz dazu offenbaren genetische Studien eine Beteiligung von Condensin II-spezifischen Proteinen an diversen Meiose-spezifischen Prozessen in der weiblichen und männlichen Keimbahn (Hartl et al., 2008a; Hartl et al., 2008b). Die Funktion des Condensin I-Komplexes in diesen Prozessen ist bislang jedoch nur unzureichend untersucht. Zwar wurde initial eine Oogenese-spezifische Funktion der peripheren Untereinheit CapG bei der Disassemblierung des SC und bei der Aufrechterhaltung der Chromosomen-Konfiguration in Meiose I nachgewiesen (Resnick et al., 2009), bezüglich der Funktion von Condensin I in der Spermatogenese existieren dagegen keine zuverlässigen Daten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb potentielle Funktionen des Condensin I-Komplexes im Kontext der männlichen Keimzellbildung analysiert und charakterisiert werden.

3.1 Vorteile der CRISPR/Cas-vermittelten Genommodifikation

Um Eigenschaften und Funktionen von Condensin I untersuchen zu können, sollten einzelne Untereinheiten des Komplexes mit fluoreszierenden Markerproteinen fusioniert werden. Die Möglichkeiten der Genommanipulation wurden durch die Entdeckung der CRISPR/Cas-

Technologie in allen gängigen Modellorganismen, wie Maus (Li et al., 2013; Wang et al., 2013), Pflanzen (Shan et al., 2013), Pilzen (DiCarlo et al., 2013) und *D. melanogaster* (Bassett and Liu, 2014a; Bassett and Liu, 2014b) sowie in humaner Zellkultur (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013) grundlegend revolutioniert. Das CRISPR/Cas-System ermöglicht die gezielte Manipulation der endogenen Genloci und offenbart einige entscheidende Vorteile gegenüber den gängigen, in der *D. melanogaster*-Genetik verwendeten, Transgeneseverfahren. Bislang wurden Transgene entweder durch Transposon-vermittelte Integration (Lobo et al., 1999; Loukeris et al., 1995; Spradling and Rubin, 1982) an weitgehend zufälligen Positionen eingeführt oder durch Rekombinase-abhängige Verfahren an vordeterminierten Zielsequenzen in das Genom integriert (Bischof et al., 2007; Groth et al., 2004). In beiden Fällen wird die Expression des Transgens zumeist von Positionseffekten, d. h. durch die unmittelbare genomische Umgebung des Transgens beeinflusst. Die Folge ist eine starke Variabilität in Bezug auf Expressionsmuster und Expressionslevel. Die funktionelle Analyse modifizierter Proteinvarianten erfordert die Depletion der korrespondierenden wildtypischen, endogenen Allele. Daher müssen entsprechende mutante Allele durch konsekutive und meist zeitaufwändige Kreuzungsstrategien häufig nachträglich in den genetischen Hintergrund integriert werden. Die Kombination multipler Transgeninsertionen innerhalb eines Fliegenstammes kann, infolge der hohen Mutationslast, die Fitness und Viabilität der Individuen enorm beeinträchtigen. Des Weiteren bergen die herkömmlichen Transgeneseverfahren ein erhöhtes Risiko von unerwünschten Sekundärmutationen. Derartige als *second site hits* bezeichnete Läsionen können bei der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation mit einer hohen Frequenz von über 30 % auftreten (Kahsai et al., 2016; Salzberg et al., 1997). *Second site hits* können essentielle Gene inaktivieren (rezessive Letalmutationen) oder in ihrer Aktivität einschränken und somit die Fitness und Viabilität der etablierten Stämme zusätzlich reduzieren. Durch die präzise Modifikation an den endogenen Genloci können derartige Effekte auf ein Minimum reduziert werden. Die kodierten Transgene unterliegen derselben transkriptionellen und posttranskriptionellen Kontrolle wie deren korrespondierende endogene Genprodukte. Dadurch wird eine Expression auf nahezu physiologischen Leveln sichergestellt. Um sich diese Vorteile zu Nutze zu machen, wurde in der vorliegenden Arbeit das CRISPR/Cas-System etabliert und verwendet, um *EGFP*-markierte Condensin-Allele durch präzise *knockins* an deren endogenen Genloci zu erzeugen.

3.2 Erzeugung EGFP-markierter Condensin-Untereinheiten durch CRISPR/Cas-vermittelte Genommanipulation

Das CRISPR/Cas-abhängige endogene *tagging* basiert auf der ortsspezifischen Induktion von DSBs und der anschließenden Integration heterologer DNA-Sequenzen durch den zelleigenen HR-Reparaturmechanismus (Sander and Joung, 2014). Die fundamentale Voraussetzung für eine Genommodifikation auf Basis der homologen Rekombination ist die Präsenz einer Donor-DNA mit den vordefinierten genetischen Veränderungen sowie homologen Sequenzbereichen auf beiden Seiten der Rekombinationsstelle (Beumer et al., 2008; Beumer et al., 2013). Aufgrund der stetig wachsenden Anzahl an Publikationen, welche die CRISPR/Cas-vermittelte Genommanipulation in *D. melanogaster* adressieren, konnte bereits eine Vielzahl an Parametern diagnostiziert werden, die die Effektivität der Mutagenese maßgeblich steuern. Um optimale Bedingungen für die HDR-abhängige Modifikation von *CapG* und *Barren* zu schaffen, wurden sowohl Donor-DNA als auch chiRNA unter Berücksichtigung mehrerer dieser Parameter konfiguriert. Die Donor-DNA kann in unterschiedlichen Konfigurationen bereitgestellt werden: als lineare, einzelsträngige DNA (ssDNA) oder circuläre, doppelsträngige DNA (dsDNA) (Bedell et al., 2012; Beumer et al., 2013; Cong et al., 2013; Wang et al., 2013). Für eine effiziente Integration langer Gensequenzen, wie der kodierenden Region für EGFP (>700 bp), lassen sich mit Plasmid-basierten, doppelsträngigen DNA-Konstrukten nachweislich höhere Rekombinationsraten erzielen (Beumer et al., 2008; Port et al., 2014). Eine weitere Determinante für die Effizienz der HDR stellt nachweislich die Länge der Homologiebereiche dar (Beumer et al., 2013). Der Mechanismus der homologen Rekombination erfordert eine Mindestlänge an homologen Sequenzen zwischen Donor- und Empfänger-DNA, da nur so eine adäquate Stabilität der Rekombinationsintermediate nach Stranginvasion sichergestellt werden kann. Studien, in denen die Anforderungen an die Homologiebereiche detailliert untersucht wurden, verdeutlichen, dass homologe Sequenzen von weniger als 1 kb beiderseits der Integrationsstelle nicht geeignet sind, um hohe Rekombinationsraten zu erzielen (Beumer et al., 2013). Für die Konfiguration der Donor-Plasmide pSI-CapG^C-FSV3FE und pSI-Barren^C-FSV3FE wurden daher homologe Regionen *upstream* und *downstream* der DSB-Stelle von mindestens 1 kb gewählt. Auch die Auswahl geeigneter Zielsequenzen ist für den Erfolg der CRISPR/Cas-vermittelten Genommodifikation ausschlaggebend. Bei der homologen Rekombination kann beobachtet werden, dass die Inkorporation der Donor-Sequenz mit

zunehmender Distanz zur Rekombinationsstelle abnimmt (Beumer et al., 2013; Paques and Haber, 1999). Für die C-terminale Fusion von Proteinen sollte der artifiziell induzierte Doppelstrangbruch im Optimalfall nicht mehr als 40 nt *upstream* oder *downstream* des Stopcodons erzeugt werden. Die für das *tagging* von *CapG* und *Barren* konfigurierten chiRNAs (G-E6 bzw. B-E3) ermöglichen die Cas9-abhängige Spaltung 47 bzw. 35 nt *upstream* des jeweiligen Stopcodons. Die gemäß den genannten Beschaffenheiten konfigurierten, für chiRNA und Donor-DNA kodierenden Plasmide wurden in syncytiale Embryonen des Genotyps *nos-Cas9* co-injiziert, welche die Endonuclease Cas9 unter Kontrolle des keimbahnspezifischen Promotors *nanos* exprimieren (Ren et al., 2013). In *D. melanogaster* wurden verschiedenartige Methoden erprobt, die Endonuclease für die CRISPR/Cas-basierte Genomeditierung bereitzustellen. Cas9 kann entweder durch Injektion von *in vitro* transkribierter Cas9 mRNA (Bassett et al., 2013; Yu et al., 2013), durch Injektion von Plasmid-DNA (Baena-Lopez et al., 2013; Gratz et al., 2013) oder ausgehend von einer transgenen Quelle (Ren et al., 2013; Sebo et al., 2014) bereitgestellt werden. Als effektivste Variante unter diesen hat sich die Transgen-abhängige, keimbahnspezifische Expression von Cas9 erwiesen. Zum einen können durch die Injektion in Cas9-transgene Fliegen hohe Mutationsraten von über 40 % erzielt werden, zum anderen wird das Risiko der Mutagenese somatischer Zellen durch das limitierte, gewebespezifische Expressionsmuster von Cas9 auf ein Minimum begrenzt (Ren et al., 2013). Die somatische Mutagenese kann die Viabilität und Überlebensrate der injizierten G0-Individuen negativ beeinflussen (Ren et al., 2013).

Wenn sich die Integration der designierten Sequenz nicht phänotypisch manifestiert, gestaltet sich die Identifikation positiver Rekombinationsereignisse schwierig. Als weit verbreitete Technik positive HDR-Ereignisse zu selektionieren, hat sich die Inkorporation exogener Sequenzen mit konditionalen, leicht visualisierbaren Markergenen etabliert (Baena-Lopez et al., 2013; Gratz et al., 2014; Xue et al., 2014; Zhang et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde die für EGFP-kodierende Sequenz daher zunächst als Bestandteil einer aus mehreren DNA-Elementen zusammengesetzten Expressionskassette FRT-SV40-3xP3-FRT-EGFP (FSV3FE) in den designierten Genlocus rekombiniert (Abb. 8). Eine erfolgreiche CRISPR-induzierte Genomeditierung kann so unmittelbar durch grüne Augenfluoreszenz der G1-Individuen identifiziert werden. Unter den gegebenen Parametern konnten für die Mutagenese von *CapG* und *Barren* in der G1-Nachkommenschaft von injizierten Männchen (G0) positive HDR-Ereignisse von 25 % im Fall von *CapG-FSV3FE* und

28 % im Fall von *Barren-FSV3FE* erzielt werden (Abb. 10). Neben der Modifizierung der *CapG*- und *Barren*-Genloci gelang es in der Arbeitsgruppe weitere Condensin-unabhängige Gene, *teflon* und *brahma*, über CRISPR-induzierte HDR C-terminal mit EGFP zu fusionieren (Simmler, 2016 und unveröffentlichte Daten). In beiden Fällen lag die zugrundeliegende Rekombinationseffizienz für den *knockin* der Reporterkassette mit 10 % bzw. 11 % jedoch deutlich unter der für die Condensin-spezifischen Gene. Eine zusätzliche Steigerung der HDR-Effizienz ließe sich mutmaßlich durch Injektion in *Lig4*⁻-mutante Fliegenstämme erzielen. Die DNA Ligase IV fungiert als eine zentrale Komponente des NHEJ *pathways* indem sie die Verknüpfung der freien DSB-Enden katalysiert (Gorski et al., 2003). Durch Eliminierung von *Lig4* kann die Reparatur von DSBs durch NHEJ supprimiert und die Reparatur zu Gunsten der homologen Rekombination verschoben werden. Gemäß bereits veröffentlichten Daten kann durch Injektion in *Lig4*⁻-mutante Embryonen eine Effektivitätssteigerung von bis zu 40 % erreicht werden (Zhang et al., 2014; Beumer et al., 2013). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden initiale Versuche unternommen die Integrationseffizienz auf diese Weise zu modulieren. Es wurden Donor-DNA und chiRNA in Embryonen injiziert, welche die Endonuclease Cas9 unter Kontrolle des ubiquitären Act5C Promotors exprimieren und zugleich zwei Nullallele (*Lig*¹⁶⁹) für *Lig4* tragen (Zhang et al., 2014). Anders als bei Zhang et al., 2014 und Beumer et al., 2013 konnte hier jedoch kein positiver Einfluss auf die Häufigkeit der CRISPR-induzierten HDR-Ereignisse beobachtet werden. Obwohl die HDR-Reparatur durch Deletion von *Lig4* deutlich favorisiert sein sollte, konnten positive Rekombinationsereignisse lediglich mit einer Rate von 3 % beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In dem von uns verwendeten experimentellen System muss ein zweiter Injektionsschritt erfolgen, bei dem der von beiden FRT-sites flankierte Sequenzbereich der Reporterkassette wieder entfernt wird und dabei die kodierenden Bereiche des gewünschten Gens und *EGFP* fusioniert werden. Die als Rekombinationsprodukt entstehenden Allele sind dann durch einen offenen Leserahmen zwischen Gen und *EGFP* mit einer kurzen Linkerregion in Form einer der beiden FRT-sites gekennzeichnet (Abb. 8). Die klassische Methode, um Flp-Rekombinase zur Verfügung zu stellen, ist die Kreuzung mit Fliegen, welche Flippase unter Kontrolle eines Hitzeschock-induzierbaren Promotors exprimieren. Durch Hitzeschockbehandlung der Nachkommen im Larvalstadium kann die Expression der Flp-Rekombinase ubiquitär in somatischen und Keimbahnzellen aktiviert werden. Da sich in

initialen Versuchen herausstellte, dass die Flp-abhängige Rekombination unter diesen Umständen mitunter nur sehr ineffizient abläuft und sich zum Teil nur geringe Rekombinationsfrequenzen von 2 % erzielen ließen (Simmler, 2016), sollte eine alternative Möglichkeit erprobt werden Flp-Rekombinase zu exprimieren. Die Fusion von *EGFP* an das 3'-Ende von *Barren* erfolgte daher durch Injektion von *in vitro* synthetisierter Flippase mRNA in Embryonen der Fliegenstämme *w**; *Barren-FSV3FE/CyO*, *P[ry⁺, ftz lacZ]*. Die Flp-abhängige Excision von *FRT-SV40-3xP3* gelang in diesen Fall mit einer Rekombinationseffizienz von 81 % (Abb. 10). Eine ähnlich hohe Rekombinationsrate ließ sich bei der Erzeugung des Allels *teflon-FE* erzielen (Daten nicht gezeigt).

Screening-Methoden, die auf der vorübergehenden Integration von Markergenen basieren, sind aufwendig und zeitintensiv. Die Entfernung des *EGFP*-Markergens durch die ortsspezifische Rekombination erfordert einen zusätzlichen Zeitaufwand von mehreren Generationszeiten. Um zukünftig auch subtile Veränderungen innerhalb einer Gensequenz ohne zusätzliche Integration eines Markergens erzeugen zu können, wäre es wünschenswert alternative Verfahren zu nutzen, um positive CRISPR-induzierte Rekombinationsereignisse detektieren zu können. In unabhängigen Studien wurden alternative, Marker-freie Screeningstrategien erprobt. Als effiziente Methode erscheint das co-CRISPR-Verfahren (Arribere et al., 2014; Kane et al., 2017; Kim et al., 2014; Ward, 2015). Dieses bedient sich der Tatsache, dass zugleich mehrere CRISPR-Ereignisse innerhalb einer einzelnen Zelle stattfinden können (Cong et al., 2013; Wang et al., 2013) und beruht auf der Co-Modifikation zweier unabhängiger genomischer Loci: dem des Zielgens sowie dem eines optionalen Markergens. Als geeignete Markergene in *D. melanogaster* erweisen sich Gene, deren Mutation in einfach zu erkennenden Phänotypen resultiert aber gleichzeitig die Fitness der mutierten Individuen kaum einschränkt. Beispiele sind Gene, welche bestimmte Körpermerkmale wie Augenfarbe (*white*) oder Körperfarbe (*ebony*) determinieren (Ge et al., 2016; Kane et al., 2017). Durch multiple CRISPR-Ereignisse kann ein sichtbarer Phänotyp erzeugt und simultan die gewünschte Veränderung im Zielgen generiert werden. In ersten diesbezüglichen Studien konnte eine hohe Koinzidenz beider CRISPR-Ereignisse verzeichnet werden. Nachkommen mit CRISPR-induzierten Mutationen innerhalb des Markergens weisen eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine gleichzeitige Modifikation des Zielgens auf (Kane et al., 2017). Durch den leicht identifizierbaren Phänotyp kann eine

Vorselektion getroffen werden und die Anzahl zu screenender Individuen maßgeblich reduziert werden.

3.3 Lokalisationsprofil von Condensin I-Untereinheiten in Meiose

Entsprechend ihrer Chromatin-organisierenden Funktion lokalisieren und assoziieren die beiden Condensin-Komplexe mit dem Chromatin und zählen zu den abundantesten Nicht-Histon-Komplexen an mitotischen und meiotischen Chromosomen (Chan et al., 2004; Cuylen et al., 2011; Hirano et al., 1997; Ono et al., 2003; Viera et al., 2007; Yu and Koshland, 2003). Durch immunfluoreszenzmikroskopische Analysen an HeLa-Zell-Chromosomen gelang es erstmals deren Lokalisation an mitotischen Chromosomen zu visualisieren (Ono et al., 2003). Condensin I- und II-spezifische Untereinheiten konnten dabei hochauflösend in einem alternierenden Muster entlang der zentralen Achse kondensierter Chromosomen nachgewiesen werden (Ono et al., 2003). Auch in *D. melanogaster* ist die Anreicherung der Condensin I-Proteine am mitotischen Chromatin evident (Herzog et al., 2013; Oliveira et al., 2007). Trotz ihrer nachweislichen Beteiligung an diversen Chromatin-strukturierenden Prozessen in *D. melanogaster* Meiose (Hartl et al., 2008b; Resnick et al., 2009) wurde die Lokalisation von Condensin-Proteinen am meiotischen Chromatin in keiner der korrespondierenden Studien adressiert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Chromatinassoziation einzelner Untereinheiten des Condensin I-Komplexes während der meiotischen Teilungen untersucht. *In vivo* mikroskopische Analysen an kultivierten Spermatozyten demonstrieren eine transiente Kolokalisation der Untereinheiten SMC2, CapG, CapD2 und Barren mit dem meiotischen Chromatin von NEBD bis zur späten Anaphase/frühen Telophase (Abb. 12 und Abb. 37 Anhang). In Spermatogonien von Mäusen konnte eine äquivalente Chromatinassoziation der Nicht-SMC-Untereinheiten von Condensin I ab Prometaphase beobachtet werden (Viera et al., 2007). Die beobachteten Lokalisationsprofile der Condensin I-Untereinheiten sind außerdem konsistent mit den in der Literatur für Condensin I und II beschriebenen Lokalisationsmustern in somatischen Zellen. Während Condensin I in der Interphase präferentiell cytoplasmatisch angereichert ist und erst nach NEBD Zugang zum Chromatin erhält, ist Condensin II bereits in Interphase nukleär lokalisiert (Gerlich et al., 2006; Hirota et al., 2004; Maeshima and Laemmli, 2003; Ono et al., 2004). Basierend auf der Annahme, dass SMC2 eine integrale Proteinkomponente beider

Condensin-Komplexe darstellt, wäre zu erwarten gewesen, dass ein signifikanter Anteil von SMC2 bereits vor dem NEBD sichtbar am Chromatin akkumuliert. Das entgegen den Erwartungen auftretende primär cytoplasmatische Lokalisationsmuster von SMC2 bekräftigt bestehende Zweifel an der Existenz eines Condensin II-Komplexes in *D. melanogaster* (Herzog et al., 2013). *In vivo* Analysen an embryonalen Kernteilungen in *Drosophila* zeigen übereinstimmend, dass die einzelnen Untereinheiten des Condensin I-Komplexes während der Interphase im Cytoplasma lokalisieren und erst in der frühen Prophase rapide mit dem Chromatin assoziieren (Oliveira et al., 2007; Herzog et al., 2013). Eine Ausnahme unter diesen bildet dabei die periphere HEAT-Untereinheit CapG, welche auch in Interphase Chromatin-assoziiert vorliegt (Herzog et al., 2013). Die spezifische subzelluläre Lokalisation von CapG in Interphase wird maßgeblich durch mehrere, im C-terminalen Drittel befindliche Kernimportsequenzen reguliert. Es wird spekuliert, dass CapG, basierend auf seiner frühen Chromatinassoziation, als Rekrutierungsfaktor fungiert und als Adaptor-Protein die chromosomale Lokalisation der verbleibenden Condensin I-Untereinheiten dirigiert (Herzog et al., 2013). Die im Gegensatz zur Mitose erst spät eintretende Ladung von CapG an das Chromatin suggeriert folglich, dass die Rekrutierung des Condensin I-Komplexes in Meiose unabhängig von einer vorausgehenden CapG-Lokalisation erfolgt. Basierend auf dem differenziellen Lokalisationsmuster in Mitose und Meiose muss die Existenz alternativer Regulationsmechanismen postuliert werden, welche die Lokalisation von CapG in Meiose steuern. Ein potentielles Szenario wäre ein gerichteter Kernexport in der Interphase unter dem Einfluss etwaiger Kernexportsequenzen (NES), welche in diesem Fall die Wirkung der Kernlokalisierungssignale egalalisieren würden. Tatsächlich enthält die Aminosäuresequenz von CapG zwei durch Computer-gestützte Programme vorhergesagte Kernexportsignale (Herzog, 2011). Durch gezielte Mutagenese könnte in zukünftigen Experimenten die funktionelle Relevanz der NES für die Meiose-spezifische Lokalisation von CapG determiniert werden.

3.4 Dynamik der meiotischen Chromatinassoziation von Condensin I

In initialen Experimenten, in denen die Stabilität der Chromatinassoziation von Condensin während der Mitose thematisiert wurde, zeichnete sich ab, dass diese nicht auf einer statischen Wechselwirkung beruht. Stattdessen kann eine Vielzahl der Chromatin-

gebundenen Condensin I-Komplexe dynamisch mit der cytosolischen Proteinfraction ausgetauscht werden (Gerlich et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Co-Immunpräzipitationsexperimente, in denen nachgewiesen wurde, dass alle Condensin I-Untereinheiten aus löslichen, mitotischen Extrakten co-präzipitiert werden können, legen nahe, dass Condensin-Holokomplexe bereits im Vorfeld der Chromatinassoziation vollständig assembliert werden (Hirano et al., 1997; Savvidou et al., 2005). Das dynamische Verhalten einzelner Untereinheiten reflektiert somit sehr wahrscheinlich das Verhalten des gesamten Condensin-Komplexes. Durch FRAP-Experimente an Condensin-Untereinheiten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Chromatinassoziation des Condensin I-Komplexes in Meiose ebenfalls dynamisch ist. Repräsentativ wurden die dynamischen Eigenschaften der Condensin I-spezifischen Proteine Barren-FE und EGFP-CapD2 untersucht. In beiden Fällen kann nach Fluoreszenzbleichung an Metaphasechromosomen eine Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals gemessen werden (Abb. 13), was für die Neu-Rekrutierung der cytosolischen Proteine an das kondensierte Chromatin spricht. Um quantitative Aussagen über die Bindungskinetik treffen zu können, wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Für die periphere HEAT-Untereinheit EGFP-CapD2 wurde eine mobile Fraktion von 59 % ermittelt, die mit einer Halbwertszeit von 693 sec ausgetauscht wird. Im Fall von Barren-FE scheint lediglich eine Subpopulation von 25 % dynamisch zu binden und mit einer deutlich längeren Halbwertszeit von 990 sec umgesetzt zu werden, während die Mehrheit der Barren-FE Moleküle stabil mit dem Chromatin assoziiert. Die auffallend geringere Dynamik von Barren könnte ein Indiz dafür sein, dass die aus den Kernuntereinheiten SMC2, SMC4 und der Kleisin-Untereinheit Barren gebildete zentrale Ringstruktur von Condensin stabiler am Chromatin bindet als die peripheren HEAT-Untereinheiten CapD2 und CapG. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste im Folgenden das dynamische Verhalten weiterer Untereinheiten charakterisiert werden. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die hier bestimmten Bindungsdynamiken lediglich als näherungsweise Abschätzung zu werten sind und nur bedingt den reellen Wert widerspiegeln. Aufgrund des limitierten Zeitfensters zwischen Photobleichung und Eintritt in die Anaphase war es nicht möglich, die Fluoreszenzregeneration bis zum Erreichen des Maximums zu detektieren. Dies führt dazu, dass sich das wiederkehrende Fluoreszenzsignal in der Exponentialfunktion nicht asymptotisch dem Grenzwert nähert, was einen Ungenauigkeitsfaktor bei der Berechnung von Halbwertszeit und Austauschrate darstellt.

Um die Dynamik über eine längere Zeitspanne verfolgen zu können, erscheint es als sinnvoll, die zu untersuchenden Kerne zukünftig durch Inkubation mit Mitosehemmstoffen in Metaphase zu arretieren. Hierbei könnte der Hemmstoff Demecolcin verwendet werden, dessen inhibitorischer Effekt auf die meiotische Progression *in vivo* bereits bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Einen weiteren Ungenauigkeitsfaktor bei der Auswertung stellt die ausgeprägte Hintergrundfluoreszenz im Detektionsbereich von EGFP dar, welche bei der Signalverarbeitung zu einem störenden Rauschsignal führt. Dadurch können subtile Fluoreszenzveränderungen womöglich nicht mehr eindeutig erfasst werden. Nichtsdestotrotz lassen sich anhand der gewonnenen Daten erste Rückschlüsse ziehen. So scheint sich die Dynamik der Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose deutlich von der in Mitose zu unterscheiden. In mitotischen Teilungen von *D. melanogaster*-Embryonen konnte für Barren eine mobile Fraktion von 84 % und eine Halbwertszeit von 120 sec (Oliveira et al., 2007), für CapD2 eine mobile Fraktion von 40 % sowie eine Halbwertszeit von 36 sec (Stefan Heidmann, pers. Mitteilung) gezeigt werden. Diese bemerkenswert schnelle Regenerationsrate ist höchstwahrscheinlich das Resultat der enormen Geschwindigkeit der syncytialen Teilungen während der frühen *D. melanogaster* Embryogenese, welche mit rapiden Umstrukturierungen des Chromatins einhergehen (Oliveira et al., 2007).

3.5 Die Rolle von Aurora B Kinase bei der Chromatinassoziation von Condensin I in Meiose

Die Interaktion der Condensin-Komplexe mit dem Chromatin wird durch synergistische Effekte zahlreicher regulatorischer Proteine und posttranslationaler Modifizierungen gesteuert (zur Übersicht siehe Haering and Gruber, 2016; Hirano, 2012). In *D. melanogaster* und zahlreichen weiteren Organismen wurde eine funktionelle Relevanz der Kinase Aurora B für den Vorgang der Chromosomenkondensation sowie die Assoziation von Condensin mit dem mitotischen Chromatin geschildert (Giet and Glover, 2001; Kaitna et al., 2002; Lipp et al., 2007; Petersen and Hagan, 2003; Tada et al., 2011; Takemoto et al., 2007). Immunpräzipitationsexperimente in HeLa-Zellen zeigten erstmals, dass die drei Nicht-SMC-Untereinheiten von Condensin I *in vitro* und *in vivo* Aurora B-abhängig phosphoryliert werden (Lipp et al., 2007). In weiterführenden Experimenten konnte schließlich nachgewiesen werden, dass die Aurora B-abhängige Phosphorylierung von CapH/Cnd2 für die Chromatinassoziation von Condensin I sowohl in humanen als auch Hefezellen

erforderlich ist. Durch die Aurora B-vermittelte Phosphorylierung wird die Interaktion der Kleisin-Untereinheit mit der N-terminalen Domäne des Histons H2A bzw. dessen Variante H2A.Z begünstigt und Condensin so an die DNA rekrutiert (Tada et al., 2011). Die Mutation der evolutionär konservierten Aurora B-Phosphorylierungsstelle an Position T43 des *D. melanogaster* CapH-Homologs Barren (Tada et al., 2011) hat jedoch keinen Effekt auf dessen Chromatinlokalisation in Meiose (Abb. 14). Durch bioinformatische Sequenzanalysen (<http://prosite.expasy.org>) wurde die Aminosäuresequenz von Barren deshalb auf das Vorhandensein zusätzlicher Aurora B-Konsensusmotive ([KR]-x-[ST][ILV]) hin untersucht. Dabei konnte eine zweite potentielle Aurora B-Phosphorylierungsstelle an Position T194 vorhergesagt werden. Um die Funktionalität dieser, und eventuell weiterer, mutmaßlicher Phosphorylierungsstellen zu analysieren, wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit rekombinant hergestellter *D. melanogaster* Aurora B Kinase durchgeführt. Bislang konnte keine experimentelle Evidenz für die Phosphorylierung von Barren durch Aurora B Kinase *in vitro* erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass die Aurora B-abhängige Chromatinassoziation von Condensin auf anderen Mechanismen als der Phosphorylierung der Kleisin-Untereinheit Barren beruht. Ein mögliches Szenario wäre die Rekrutierung von Condensin durch posttranslationale Modifikation von Histonproteinen. Der Prozess der Chromosomenkondensation geht mit einer Mitose und Meiose-spezifischen Phosphorylierung der Histone H3 und H1 einher (Bradbury, 1992; de la Barre et al., 2000; Hendzel et al., 1997; Wei et al., 1998; Wei et al., 1999). Zudem konnte eine DNA-unabhängige Interaktion des Condensin-Komplexes mit Histon H3 sowie die Kolokalisation beider Komponenten in lokal kondensierten Chromatinregionen während der frühen Prophase am G2/M Übergang identifiziert werden. Basierend auf diesen Daten wurde bereits ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Chromatinrekrutierung von Condensin und der Phosphorylierung von Kern-Histonen postuliert (Schmiesing et al., 2000). Tatsächlich führt die Mutation der mitotischen Phosphorylierungsstelle von Histon H3 (Serin 10) in *Tetrahymena* zu einer eingeschränkten Chromosomenkondensation und -segregation (Wei et al., 1999). Auf ähnliche Weise führt die Inhibition der Histon H3-Phosphorylierung durch RNAi-vermittelte Depletion von Aurora B Kinase in *Drosophila* S2-Zellen zu einer unvollständigen Chromosomenkondensation sowie zu einer verminderten Rekrutierung von Barren an das Chromatin (Giet and Glover, 2001). Da äquivalente Histon H3-Phosphorylierungen auch in Meiose stattfinden, wäre auch hier ein mechanistischer

Zusammenhang mit der Rekrutierung von Condensin denkbar. Weder die RNAi-vermittelte Depletion noch die chemische Inaktivierung von Aurora B Kinase durch Binuclein 2 jedoch führen zu einer signifikanten Delokalisation der Kleisin-Untereinheit Barren vom meiotischen Chromatin (Abb. 15). Eine Minderung des Levels an Chromatin-gebundenem Barren kann anhand der vorliegenden Daten allerdings nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Abb. 15). Subtile Veränderungen der Chromatinassoziation könnten in zukünftigen Experimenten durch Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Barren-FE identifiziert werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten suggerieren daher, dass die Funktion von Aurora B Kinase für die chromosomale Assoziation von Condensin I während der männlichen Meiose in *D. melanogaster* keine oder lediglich eine untergeordnete Rolle spielt. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bereits zuvor in der Meiose von *C. elegans* beschrieben (Collette et al., 2011). Demnach ist Aurora B in Meiose nicht für die initiale Chromatinassoziation von Condensin I notwendig, sondern dirigiert lediglich dessen korrekte Verteilung und räumliche Lokalisation entlang der Chromosomen (Collette et al., 2011). Es ist somit vorstellbar, dass Aurora B Kinase speziesspezifisch unterschiedliche Rollen beim chromosomalen *targeting* von Condensin I in Mitose und Meiose spielt.

3.6 Die Rolle von Condensin I bei der meiotischen Chromosomensegregation während der männlichen Keimzellbildung in *D. melanogaster*

Die Assoziation mit dem Chromatin in Meiose liefert ein erstes Indiz für eine potentielle Funktion von Condensin I während dieses Prozesses. In weiterführenden Experimenten sollte die Funktion bei der männlichen Keimzellbildung genauer charakterisiert werden. Klassische *loss-of-function* Mutationen sind für Genfunktionsanalysen in der Keimbahn nicht geeignet, da die für die Condensin I-Untereinheiten kodierenden Gene für die mitotische Proliferation essentiell sind (Bhat et al., 1996; Dej et al., 2004; Jager et al., 2005). Daher musste Condensin I gezielt in der männlichen Keimbahn inaktiviert werden. Durch RNAi in Kombination mit dem binären Gal4/UAS-System können die entsprechenden Gentranskripte konditional degradiert und *loss-of-function* Phänotypen ausschließlich in designierten Geweben erzeugt werden. Um die zentrale Frage zu beantworten, ob der Condensin I-Komplex für die männliche Meiose in *D. melanogaster* essentiell ist, wurde die Fertilität Condensin-depletierter Individuen untersucht. Während Männchen nach *knockdown* von Barren und CapG relativ zum Wildtyp signifikant weniger Nachkommen hervorbringen, führt

die Depletion von SMC2 zu vollkommener Sterilität der betreffenden Individuen (Abb. 19). Ein vergleichbarer Effekt auf die männliche Fertilität konnte durch proteasomale Degradation sowie proteolytische Spaltung der Kleisin-Untereinheit Barren reproduziert werden (Abb. 28 und 30). Diese Beobachtung indiziert erstmals, dass der Condensin I-Komplex in der Spermatogenese von *D. melanogaster* zwar eine wichtige, aber dennoch nicht unverzichtbare Funktion innehat. Die massive Ausprägung des Phänotyps im Fall des SMC2 *knockdowns* ist vermutlich darin begründet, dass der Abbau der zellulären SMC2 mRNA mit der Funktionalität beider putativer Condensin-Komplexe interferiert. Dieser vermeintliche additive Effekt der Co-Depletion von Condensin I und II suggeriert, dass beide Komplexe während der Meiose zwar teilweise überlappende, aber nicht-redundante Funktionen erfüllen. Tatsächlich ist auch für Condensin II-spezifische Proteine bereits eine essentielle Funktion bei der Chromatinorganisation in der männlichen Meiose von *D. melanogaster* bekannt. *CapH2*- und *CapD3-loss-of-function* Mutationen führen ebenfalls zu männlicher Sterilität (Hartl et al., 2008b). Untersuchungen bezüglich der Funktion beider Condensin-Komplexe in der Meiose von Mäusen liefern jedoch widersprüchliche Befunde. Demzufolge besitzt lediglich der Condensin II-Komplex eine essentielle meiotische Funktion. Condensin I erfüllt überlappende Funktionen, ist jedoch sonst redundant. Während die konditionale Depletion von Ncaph1 in Mäusen keine oder nur milde Effekte hervorruft, hat die Depletion von NCaph2 eine komplette Sterilität zur Folge (Houlard et al., 2015).

Befunde, wonach Condensin I-depletierte Männchen eine dezimierte Menge reifer Spermien produzieren und durch deren Kreuzung mit wildtypischen Weibchen ein erhöhter Anteil unbefruchteter Embryonen abgelegt wird (Abb. 20), belegen zweifelsfrei, dass der beobachtete Fertilitätsverlust bereits im Vorfeld der Kopulation durch Defekte während der männlichen Keimzellbildung verursacht wird. Der Anteil unbefruchteter Embryonen reflektiert dabei jedoch nicht die korrespondierende Schlüpftrate im Fertilitätstest. Gemäß der Quantität der Nachkommenschaft wäre eine deutlich höhere Anzahl unbefruchteter Embryonen zu erwarten gewesen. Dies veranlasste mich anzunehmen, dass eine weitere Subpopulation von Embryonen existiert, die befruchtet ist, aber im Verlauf der Embryonalentwicklung abstirbt. Eine falsche Anzahl an Chromosomen kann infolge von Gendosiseffekten ursächlich für die verminderte Vitalität und embryonale Letalität sein. Klassische *Nondisjunction*-Analysen bestätigen eine erhöhte Frequenz chromosomaler Fehlsegregationsereignisse nach RNAi-vermittelter Inaktivierung von Condensin I (Abb. 23).

Mit bis zu 25 % im Fall des IV. Chromosoms und bis zu 10 % im Fall der Geschlechtschromosomen konnte in dieser Arbeit ein wesentlicher Anstieg chromosomaler *Nondisjunction*-Ereignisse verglichen mit wildtypischen Fliegen nachgewiesen werden. Analoge Experimente mit hypomorphen Allelen einzelner Condensin II-Untereinheiten lieferten dagegen keine Indizien für eine abnormale Segregation dieser Chromosomen (Hartl et al., 2008b). Lediglich im Fall des II. und III. Chromosoms konnten offensichtliche Effekte auf die meiotische Chromosomensegregation erfasst werden. Die gesteigerte Sensitivität des II. und III. Chromosoms gegenüber Fehlsegregation beruht mutmaßlich auf den strukturellen Beschaffenheiten dieser Chromosomen. Durch ihre enorme Größe und dem damit verbundenen Mehrgehalt an DNA (II. Chromosom: 60,8 Mb; III. Chromosom: 68,8 Mb) verglichen mit dem IV. Chromosom (4,4 Mb) wird für deren Kompaktierung und Individualisierung ein höheres Level funktioneller Condensin-Komplexe benötigt (Hartl et al., 2008b). Die Depletion von Condensin würde sich somit negativer auf die strukturelle Integrität der II. und III. Chromosomen auswirken und infolgedessen deren Fehlsegregation begünstigen. Die höhere Sensitivität der beiden Autosomen II und III gegenüber Fehlsegregation als die der Gonosomen beruht vermutlich auf den verschiedenartigen Mechanismen der Homologenpaarung. Während die Autosomenpaarung über die gesamte Länge der Chromosomen erfolgt, ist die Paarung der Gonosomen auf repetitive, heterochromatische rDNA Sequenzen beschränkt (McKee et al., 1992; McKee and Karpen, 1990; McKee et al., 1993). Folglich ist die an der Paarung beteiligte relative DNA Menge im Fall des II. und III. Chromosoms als größer anzunehmen, als im Fall der Gonosomen. Hartl et al., 2008b postulieren eine direkte Korrelation zwischen der für die Paarung verantwortlichen DNA-Menge und der erhöhten Sensitivität gegenüber Fehlsegregation. Basierend auf der Hypothese, dass eine ordnungsgemäße Funktionalität von Condensin für die Homologenpaarung ausschlaggebend ist, müssten *Nondisjunction*-Ereignisse schon in Anaphase I auftreten. Tatsächlich konnte für Condensin II eine essentielle Rolle bei der stabilen Adhäsion der homologen Chromosomen demonstriert werden. Entsprechend den Erwartungen führt die Mutation Condensin II-spezifischer Gene in diesen Individuen vermehrt zu Fehlsegregationseignissen während der ersten meiotischen Teilung (Hartl et al., 2008b). Anhand der durchgeführten NDJ-Analysen konnte bestätigt werden, dass auch die Depletion von Condensin I, neben einer chromosomalen Fehlsegregation in Meiose II, zu einer fehlerhaften Segregation der Gonosomen in Meiose I führt (Abb. 23). Um auch im Fall

der Autosomen zwischen einer defekten Chromosomensegregation in Meiose I oder Meiose II differenzieren zu können, müssten die zu untersuchenden Männchen zusätzlich heterozygot für eine rezessive Markermutation auf dem untersuchten Chromosom sein. Im Falle einer Co-Segregation der beiden Homologen in Meiose I würden Spermien gebildet werden, die heterozygot für diese Mutation sind ($mut^-/+$). Bei defekter Chromosomensegregation ausschließlich in Meiose II hingegen, würden aufgrund der Co-Segregation beider Schwesterchromatide Spermien auftreten, die entweder homozygot für das wildtypische Allel ($+/+$) oder für das mutante Allel sind (mut^-/mut^-). Da sowohl die Befruchtung mit $+/+$ Spermien als auch die Befruchtung mit $mut^-/+$ Spermien ein wildtypisches Erscheinungsbild hervorruft, muss, um beide phänotypischen Klassen voneinander unterscheiden zu können, die Präsenz des mutanten Allels anschließend durch geeignete PCR-Analysen nachgewiesen werden. Analog zu den für das IV. Chromosom und die Gonosomen durchgeführten genetischen *Nondisjunction*-Analysen sollte auch die Segregation des II. und III. Chromosoms untersucht werden. Derartige genetische Tests sind für diese Chromosomen aufgrund der in unserem Fall erforderlichen Allelkombinationen sehr komplex und nur schwer durchführbar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht die zweit- und drittchromosomale Segregation cytologisch durch FISH nachzuweisen. Zur Visualisierung beider Chromosomen wurden FISH-Sonden verwendet, die in repetitiven, genomischen Bereichen dieser Chromosomen hybridisieren. Da sich diese DNA-Sonden für einen Nachweis in den Spermatidenkernen als nicht funktionell erwiesen und keine eindeutig auswertbaren Signale lieferten, konnte die Segregation des II. und III. Chromosoms jedoch nicht beurteilt werden.

Als molekulare Ursache für die Aneuploidie der Keimzellen konnte eine aberrante Chromosomensegregation in Meiose identifiziert werden. Die Depletion von SMC2, CapG und Barren verhindert die effiziente Separation der Homologen und Schwesterchromatiden in Anaphase I und Anaphase II und führt zur Ausbildung von Chromatinbrücken zwischen den segregierenden DNA-Massen (Abb. 21 und 22). In Anbetracht der Tatsache, dass die männliche Meiose in *Drosophila* auf einer achiasmatischen Homologenpaarung beruht, ist die aberrante Chromosomensegregation nach Condensin-Depletion wahrscheinlich das Resultat einer defekten Chromosomenstruktur und beeinträchtigten Auflösung chromosomaler Verflechtungen. Es ist bekannt, dass der Condensin-Komplex die Topoisomerase II-abhängige DNA-Dekatenierung begünstigt und dadurch die Entstehung

schädlicher Chromatinbrücken während der Chromosomensegregation verhindert (Charbin et al., 2014). Um die Frage zu beantworten, ob die hier beobachteten Chromatinbrücken tatsächlich auf unvollständig aufgelöste DNA-Katenierungen zurückzuführen sind, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Ein erstes Indiz liefert die Depletion von Topoisomerase II. Die Inaktivierung von Topoisomerase II in *D. melanogaster* Spermatozyten spiegelt den nach Condensin I-Depletion zu beobachtenden Phänotyp und das Auftreten von Anaphasebrücken im Verlauf beider meiotischer Teilungen wieder (Mengoli et al., 2014). Ein synergistischer Effekt von Condensin und Topoisomerase II bei der DNA-Dekatenierung und Individualisierung von Chromosomen in Meiose gilt somit als sehr wahrscheinlich.

Auch in weiteren Modellorganismen konnte eine Rolle von Condensin in diesem Prozess demonstriert werden (Hagstrom et al., 2002; Lee et al., 2011; Siddiqui et al., 2003; Yu and Koshland, 2003). Obgleich die zugrundeliegenden Daten übereinstimmend eine Funktion von Condensin auf die meiotische Chromosomensegregation bestätigen, liefern diese jedoch kontroverse Befunde bezüglich des exakten Wirkmechanismus von Condensin bei der Homologen- bzw. Schwesterchromatidtrennung. In *Arabidopsis thaliana* führt die Mutation von AtCAP-E1, einem funktionellen SMC2-Ortholog, ausschließlich zu einer beeinträchtigten Segregation der Homologen in Meiose I (Siddiqui et al., 2003), während eine Depletion von SMC4 in *C. elegans* die Schwesterchromatidtrennung in Meiose II, nicht jedoch die Homologentrennung beeinflusst (Hagstrom et al., 2002). In *S. cerevisiae* hingegen kann beobachtet werden, dass die Expression mutanter Allele der Condensin-Untereinheiten Ycg1 und Ysc4 sowohl die Chromosomensegregation in Meiose I als auch Meiose II stört (Yu and Koshland, 2003). Letzteres ist konsistent mit den hier gezeigten Beobachtungen, wonach die Depletion einzelner Condensin I-Untereinheiten zu Fehlsegregationsereignissen während der ersten und zweiten meiotischen Teilung führt (Abb. 23). Yu and Koshland postulieren, dass dem Einfluss von Condensin auf die Segregation von Homologen und Schwesterchromatiden unterschiedliche mechanistische Aktivitäten zugrunde liegen. Demnach wird die ordnungsgemäße Schwesterchromatidtrennung durch die Condensin-abhängige DNA-Dekatenierung und Individualisierung der Schwesterchromatiden sichergestellt, während die Segregation der Homologen durch den Einfluss von Condensin auf die Paarung der homologen Chromosomen gewährleistet wird. Diese Argumentation stützt sich auf die Feststellung, wonach der Condensin I-Komplex eine regulatorische Funktion bei der meiotischen Rekombination innehat (Mets and Meyer, 2009; Tsai et al., 2008; Yu and

Koshland, 2003). So konnte in *S. cerevisiae* eine Beteiligung von Condensin an der Auflösung von rekombinationsabhängigen Verknüpfungen zwischen homologen Chromosomen gezeigt werden. Durch Depletion der Meiose-spezifischen Endonuklease Spo11, die die Induktion von DSBs initialisiert, können Anaphasebrücken in Meiose I im Condensin-mutanten Hintergrund weitgehend unterdrückt werden (Yu and Koshland, 2003). Auch in *D. melanogaster* ist die Beteiligung beider Condensin-Komplexe an der Paarung homologer Chromosomen evident. So besitzt die Condensin I-Untereinheit CapG in der Oogenese eine spezifische Funktion bei der Disassemblierung des SC und der Konfiguration der homologen Chromosomen in Metaphase I. Letzteres äußert sich durch das Auftreten multipler, vorzeitig getrennter Chromatinmassen in CapG-mutanten Oocyten (Resnick et al., 2009). Trotz der erheblichen Unterschiede der Homologenpaarung in *D. melanogaster* Männchen ist eine Beteiligung von Condensin auch in diesem Prozess äußerst wahrscheinlich. In Condensin II-mutanten Individuen ist die Sequestrierung der chromosomalen Bivalente in Form der charakteristischen Chromatinterritorien in Prophase I inhibiert (Hartl et al., 2008b). Die Ausbildung der Chromatinterritorien in Prophase I jedoch ist eine entscheidende Voraussetzung für eine stabile Adhäsion der homologen Chromosomen und für deren fehlerfreie Segregation. Ein erstes Indiz für eine Beteiligung von Condensin I an der Paarung der Homologen liefert der Befund, wonach die Inaktivierung von Condensin I *Nondisjunction*-Ereignisse in Meiose I nach sich zieht (Abb. 23). Um die Frage endgültig zu beantworten, ob auch der Condensin I-Komplex als zusätzlicher Faktor für die Homologenpaarung in der männlichen Meiose benötigt wird, wurde die Formation der chromosomalen Territorien nach RNAi-vermittelter Degradation von SMC2, CapG und Barren fluoreszenzmikroskopisch analysiert (siehe Anhang, Abb. 39). In der vorliegenden Arbeit konnte keine beeinträchtigte Ausbildung von Chromatinterritorien trotz Condensin I-Inaktivierung nachgewiesen werden. An dieser Stelle muss daraufhin gewiesen werden, dass mit dem experimentellen Setup auch der Effekt einer Condensin II-Inaktivierung auf die Territorienbildung nicht reproduziert werden konnte. Das Ausbleiben eines Phänotyps nach Condensin II-Inaktivierung ist jedoch sehr wahrscheinlich auf eine unzureichende Depletion von CapH2 bzw. CapD3 durch RNAi-vermittelten Abbau zurückzuführen. Ein *knockdown* von CapH2 und CapD3 konnte während dieser Arbeit nicht experimentell bestätigt werden. Die Daten sprechen somit gegen eine Rolle des Condensin I-Komplexes bei der Strukturierung des Chromatins während der meiotischen Prophase. Dies wäre konsistent mit den Erkenntnissen der Lokalisationsstudien,

die zeigen, dass die Condensin I-Untereinheiten erst nach NEBD am Chromatin assoziieren (Abb. 12). Anders als im Fall von CapG und Barren wäre ein Effekt der SMC2-Depletion auf die prophasische Chromatinorganisation allerdings zu erwarten gewesen, da SMC2 als Bestandteil des Condensin II-Komplexes fungiert, für den eine essentielle Funktion bei der Ausbildung der Chromatinterritorien bereits beschrieben ist (Hartl et al., 2008b). Folglich scheint für die Funktion CapH2 und CapD3 bei diesem Prozess eine stringente Komplexbildung nicht erforderlich zu sein. Die Condensin II-spezifischen Untereinheiten könnten in der Keimbahn eine Komplex-unabhängige, Chromatin-strukturierende Rolle übernommen haben.

3.7 Der Einfluss von Condensin I auf die Integrität des Spermienchromatins

Nach der Depletion von Condensin weist eine Vielzahl von Spermatidenkernen zudem eine vom physiologischen Erscheinungsbild abweichende Morphologie auf (Abb. 26). Die betreffenden Kerne variieren in Größe und Gestalt oder sind augenscheinlich über feine Chromatinbrücken miteinander verbrückt, obwohl diese nach Vollendung von Anaphase II vollständig voneinander getrennt sein sollten. Kerne mit abnormaler Größe sind vermutlich durch die Variation des DNA-Gehalts zu erklären. Aneuploide Kerne besitzen mehr oder weniger als die übliche Anzahl an Chromosomen, was sich in Form einer abnormalen Größe widerspiegeln kann. Eine von der Norm abweichende Anzahl an Chromosomen konnte sowohl durch die Quantifizierung von centromerischen Cid-Signalen als auch durch FISH mit einer X-Chromosom-spezifischen Sonde bestätigt werden (Abb. 24 und 25). Häufig können als Folge einer fehlerhaften Chromosomensegregation zudem sogenannte Micronuclei beobachtet werden. Diese können entstehen, wenn einzelne Chromosomen oder DNA-Fragmente nicht zu einem der beiden Spindelpole transportiert werden (Fenech et al., 2011). Um die Präsenz von Micronuclei zu untersuchen und die Größe einzelner Spermatidenkerne exakter bestimmen zu können, wurden Spermatidenkerne unmittelbar nach Beendigung von Meiose II analysiert. Zu diesem Zeitpunkt können die Spermatidenkerne durch die Präsenz der sogenannten Nebenkern im Phasenkontrast leicht identifiziert werden. Als Nebenkern versteht man eine spezielle mitochondriale Struktur, welche sich in den postmeiotischen Spermatiden vieler Insekten formiert. Die Mitochondrien fusionieren dabei zu einem sphärischen Aggregat, welches in unmittelbarer Angrenzung an den Kern lokalisiert (Fuller, 1993). Da die Spermatidenkerne in diesem Stadium eine kreisrunde Morphologie aufweisen,

kann durch die Bestimmung des Durchmessers, deren Größe näherungsweise quantifiziert und vergleichend beurteilt werden. Allerdings konnten in diesem Stadium weder Micronuclei noch wahrnehmbare Unterschiede in Bezug auf die Größe der Kerne nach Condensin-Depletion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Andernfalls ließe sich die ungleichmäßige Größe der Nuklei auf einen unterschiedlichen Kondensationsstatus des Chromatins zurückführen. Dies könnte zugleich das heterogene Erscheinungsbild der Spermatiden erklären. Im Verlauf der Spermiogenese wird das Spermienchromatin einer drastischen Reorganisation unterzogen, um in einen hoch kompaktierten und transkriptionsinaktiven Zustand überführt zu werden. Basierend auf der Schlüsselfunktion von Condensin bei der Strukturierung des Chromatins wäre es denkbar, dass nach Inaktivierung von Condensin auch die Strukturierung des Spermatidenchromatins beeinträchtigt ist. Eine physiologische Funktion von Condensin bei der Strukturierung des Spermienchromatins ist bislang jedoch unbekannt. Eine Lokalisation von Condensin I am Chromatin reifer Spermien ist zudem nicht evident (Daten nicht gezeigt). Um den Kondensationsstatus des Spermatidenchromatins in Abwesenheit von Condensin zu untersuchen, könnten FISH-Experimente durchgeführt werden, bei denen durch Hybridisierung mit sequenzspezifischen DNA-Sonden der Abstand zweier intrachromosomaler DNA-Loci determiniert werden kann.

DNA-Massen, welche auch nach Beendigung von Meiose verbunden bleiben, könnten das Resultat einer unvollständigen Abschnürung der Spermatiden sein. Chromatinbrücken, welche auch über Anaphase hinaus persistieren, können unterschiedliche Folgen haben. Einerseits können DSBs verursacht werden, wenn ein Chromosom beim Zusammenziehen der Teilungsfurche durchtrennt wird, andererseits kann die Abschnürung beider Zellen durch Rückbildung der Furche verzögert oder inhibiert werden (Ganem and Pellman, 2012). Der *NoCut Pathway* ist eine Signalkaskade, die erstmalig in Hela-Zellen und Hefe identifiziert wurde und die Vollendung der Cytokinese als Antwort auf Anaphase-Defekte inhibiert (Mendoza et al., 2009; Steigemann et al., 2009). Die Retention einzelner Chromatinfasern innerhalb der Teilungsfurche bzw. *spindle midzone* ist hinreichend, um den *NoCut Pathway* zu aktivieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Herstellern Abcam (Cambridge, UK), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Pierce/Thermo Fisher Scientific (Bonn, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma Aldrich (München, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die eingesetzten Enzyme stammten von Fermentas/Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland).

4.1.2 Bakterienstämme

Der *E. coli* XL1-Blue Stamm wurde für die Proteinexpression, die Stämme *E. coli* DH10B sowie *E. coli* DH5 α für Klonierungen und die Vervielfältigung von Plasmid DNA verwendet.

Tabelle 1 | Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	F^- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-</i>
<i>E. coli</i> DH10B	F^- <i>endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 ϕ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str^R λ^-</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 tet^R proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17($r_K^- m_K^+$)</i>

4.1.3 Plasmide

Die folgende Tabelle enthält sowohl kommerziell verfügbare Vektoren als auch Plasmide der laborinternen Plasmidkollektion, welche in der vorliegenden Arbeit nicht selbst hergestellt wurden.

Tabelle 2 | Plasmide

Plasmid/Bezeichnung	Quelle/Referenz
pAS 1834	O. Stemmann, persönl. Mitteilung
pattB	Bischof et al., 2007
pattB-CapG ^{FL} -EGFP	Riemer, 2012
pattB-SMC2 _h -EGFP	S. Heidmann, persönl. Mitteilung
pQE30-EGFP	Dürr, 2004

pQE30-dScc1	Heidmann et al., 2004
pLITMUS28	New England Biolabs
pRSF-FA	O. Stemmann, persönl. Mitteilung
pslfa1180fa	Horn and Wimmer, 2000
pSI-CapG ^c -F3FE	Jordan, 2015
pUASP-FA	S. Heidmann, persönl. Mitteilung
pUAST	Brand and Perrimon, 1993
pU6-BbsI-chiRNA	Addgene, Gratz et al., 2013
pU6-chiRNA-G-E5	Jordan, 2015
cDNA Klon RE48802	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project

4.1.4 DNA-Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden ausschließlich zu Klonierungszwecken verwendet. Sämtliche Oligonukleotide wurden von den Firmen Microsynth/Seqlab sowie Sigma Aldrich synthetisiert.

Tabelle 3 | DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz und Verwendung
KS11	5'-GCTGAACAGCCGGCTGGATACGGC-3' Molekularer Nachweis des Allels <i>Barren-FSV3FE</i> ; hybridisiert ins <i>sense</i> Orientierung
KS13	5'-CTAAACGCTGTGCCGGAGGAGACG-3' Molekularer Nachweis des Allels <i>Barren-FE</i> ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
KS27	5'-ATAAAAGGACCTTGGTGAGATTGGCCTC-3' Einfügen einer PpuMI-Schnittstelle durch inverse PCR in <i>Barren(C)</i> ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
KS28	5'-ATAAAAGGTCCTTCGCGGACACGTTTCAT-3' Einfügen einer PpuMI-Schnittstelle durch inverse PCR in <i>Barren(C)</i> ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
KS29	5'-ATAATGTACACAAGGTGAACAGGCTACTG-3' Einfügen einer BsrGI-Schnittstelle durch inverse PCR in <i>Barren(N)</i> ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
KS30	5'-ATAATGTACAGGGGCCATCATCATCCTCG-3' Einfügen einer BsrGI-Schnittstelle durch inverse PCR in <i>Barren(N)</i> ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
KS35	5'-ATAATGTACAACACTAGGGCTAGAGAGAATTG-3' Amplifikation der TEV-Schnittstelle; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält BsrGI-Schnittstelle
KS36	5'-ATAATGTACAACACTAGCTCCCTGGAAATAAAG-3' Amplifikation der TEV-Schnittstelle; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält BsrGI-Schnittstelle

KS37	5`-ATAAAAGGACCTTACTAGGGCTAGAGAGAATTTG-3` Amplifikation der TEV-Schnittstelle; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält PpuMI-Schnittstelle
KS39	5`-GCGGTTAATTAAACGTTAAAATAATTGAATGAAGC-3` Flankierender Primer für die Erzeugung von pattB-SMC2 _h -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält PacI-Schnittstelle
KS40	5`-ATAAACGCGTATGACGCAGCTCGATCTCTGAGGTC-3` Flankierender Primer für die Erzeugung von pattB-SMC2 _h -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält MluI-Schnittstelle
KS41	5`-GGCAAAAATAAATTTCTGATTAATGGCAAGCTGGTGC-3` Mutageneseprimer für die Erzeugung von pattB-SMC2 _h -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
KS42	5'-CCATTAATCAGAAATTTATTTTTGCCTCCGACAACCAC-3' Mutageneseprimer für die Erzeugung von pattB-SMC2 _h -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
KS43	5'-ATAAGCGGCCGCATGACTCTGCCCCGCTTAG-3' Amplifikation von <i>Barren</i> ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält Start-Codon und NotI-Schnittstelle
KS44	5'-ATAAGGCGCGCCTGAATCCAACACCTGGCG-3' Amplifikation von <i>Barren</i> ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält Ascl-Schnittstelle
KS45	5'-ATAATCTAGATTACTTGTATAGCTCGTCC-3' Amplifikation von <i>EGFP</i> ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält Stopp-Codon und XbaI-Schnittstelle
KS46	5'-GCCCCAGCTCGCGCGCTCCTTCAGCAGCATC-3' Mutageneseprimer für die Mutation von T43 in <i>Barren</i> ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
KS47	5'-CTGCTGAAGGAGCGCGCGACGTCGGGCTTCC-3' Mutageneseprimer für die Mutation von T43 in <i>Barren</i> ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
KS48	5`-ATAAAAGGTCCTTACTAGCTCCCTGGAAATAAAG -3` Amplifikation der TEV-Schnittstelle; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält PpuMI-Schnittstelle
KS66	5'-ATAAAGATCTGATCATAATCAGCCA-3' Amplifikation der SV40-Terminatorsequenz, hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält BglII-Schnittstelle
KS67	5'-ATAAGGATCCGATCCAGACATGAT-3' Amplifikation der SV40-Terminatorsequenz, hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält BamHI-Schnittstelle
KS89	5`-GTACCACGTACGTACGCGTAACTAGTAC-3` Modifikation der MCS in pSL-CapG ^C -F3FE; komplementär zu KS90; enthält Acc651-, BsiWI-, MluI-, SpeI- und NcoI-Schnittstellen
KS90	5`-CATGGTACTAGTTACGCGTACGTACGTG-3` Modifikation der MCS in pSL-CapG ^C -F3FE; komplementär zu KS89; enthält Acc651-, BsiWI-, MluI-, SpeI- und NcoI-Schnittstellen

KS91	5'-ATAAACGCGTGGAAGAGCTCACTGCCGAGGAG-3' Klonierung von pSI-Barren ^C -3'UTR-noPAM-FSV3FE; hybridisiert <i>sense</i> in <i>Barren</i> Exon 2; enthält MluI-Schnittstelle
KS92	5'-ATAAGGTACCGGCAAACATGGAAATCTCATCG-3' Klonierung von pSI-Barren ^C -3'UTR-noPAM-FSV3FE; hybridisiert <i>antisense</i> in <i>Barren</i> 3'-UTR; enthält Acc651-Schnittstelle
KS93	5'-ATAAGCGGCCGCGCATCCAACACCTGGCGAATTTG-3' Klonierung von pSI-Barren ^C -3'UTR-noPAM-FSV3FE; hybridisiert <i>antisense upstream</i> von <i>Barren</i> Stopp-Codon; enthält NotI-Schnittstelle
KS94	5'-ATAAGCGGCCGCGCATTTCTTTAATTATTTTTC-3' Klonierung von pSI-Barren ^C -3'UTR-noPAM-FSV3FE; hybridisiert <i>sense</i> in <i>Barren</i> 3'-UTR <i>downstream</i> von Stopp-Codon; enthält NotI-Schnittstelle
KS95	5'-GCAAGAGGATCTGGAGGACTTTCAA-3' Mutageneseprimer für die Mutation der PAM-site in <i>Barren</i> Exon 3; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
KS96	5'-CCAGATCCTCTTGCGGAATTAGCCG-3' Mutageneseprimer für die Mutation der PAM-site in <i>Barren</i> Exon 3; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
KS97	5'-CTTCGCTAATCCGCAGGAGGACT-3' gRNA für die Modifikation von <i>Barren</i> ; hybridisiert mit KS98; kompatible Enden zu BbsI
KS98	5'-AAACAGTCCTCCTGCGGAATTAGC-3' gRNA für die Modifikation von <i>Barren</i> ; hybridisiert mit KS97; kompatible Enden zu BbsI
KS102	5'-CAGCATTTAAGGGCAACTAG-3' Molekularer Nachweis der Allele <i>Barren-FSV3FE</i> und <i>Barren-FE</i> ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
EU 87	5'-ATAAGGCGCGCCAATGGTGAGCAAGGG-3' Amplifikation von <i>EGFP</i> ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält AscI-Schnittstelle
IH01	5'-ATATCCTAGGGGCTGAGGAGGGCAATGAG-3' Flankierender Primer für die Erzeugung von pattB-CapG ^{FL} -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung; enthält AvrII-Schnittstelle
IH02	5'-CCAGGTACTCGGACAGGCATTGCCAATATAACAACAGC-3' Mutageneseprimer für die Erzeugung von pattB-CapG ^{FL} -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung
IH03	5'-ATTGGCAATGCCTGTCCGAGTACCTGGAGACGGAAGCG-3' Mutageneseprimer für die Erzeugung von pattB-CapG ^{FL} -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>sense</i> Orientierung
IH04	5'-ATCACTAAGTGAAAGTTAATTAAGTTAG-3' Flankierender Primer für die Erzeugung von pattB-CapG ^{FL} -EGFP-siRNA ^{res} ; hybridisiert in <i>antisense</i> Orientierung; enthält PaeI-Schnittstelle
SH381	5'-CGATCATAATACGACTCACTATAGGGGTCACAACATGGGCCCAAAAAAGAAAAGA-3' Amplifikation von FIp; enthält T7-Promotorsequenz
SH382	5'-ATGGCGCGCCTTATATGCGTC-3' Amplifikation von FIp

4.1.5 Antikörper

Tabelle 4 | Primäre und sekundäre Antikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Verdünnung	Quelle/Referenz
primäre Antikörper		
Kaninchen-anti-Barren IS004	WB: 1:3000	S. Heidmann, pers. Mitteilung
Kaninchen-anti-Barren IS023	IF: 1:3000	S. Heidmann, pers. Mitteilung
Kaninchen-anti-CapG(N)	WB: 1:3000	Herzog et al., 2013
Kaninchen-anti-Cid (IS1)	IF: 1:500	Jager et al., 2005
Kaninchen-anti-EGFP (IS28)	IF: 1:3000 WB: 1:3000	In dieser Arbeit affinitätsgereinigt
Kaninchen-anti-SMC2 (IS04)	WB: 1:3000	Herzog et al., 2013
Maus-anti-Tubulin	IF: 1:8000 WB: 1:20000	Sigma Aldrich
sekundäre Antikörper		
POD-Ziege-anti-Kaninchen	WB: 1:3000	Jackson Immunoresearch
POD-Ziege-anti-Maus	WB: 1:3000	Jackson Immunoresearch
Alexa488-Ziege-anti-Maus	IF: 1:600	Molecular probes
Alexa488-Ziege-anti-Kaninchen	IF: 1:600	Molecular probes
Cy3-Ziege-anti-Kaninchen	IF: 1:600	Molecular probes

4.2 Methoden im Umgang mit *D. melanogaster*

4.2.1 Fliegenstämme

Tabelle 5 | Gal4-Treiber- und Balancierstämme

Genotyp	Referenz/Quelle
<i>w[*], α4 tub-Gal4-VP16</i>	Micklem et al., 1997
<i>w[*]; P[w⁺, ey-Gal4]</i>	Hazelett et al., 1998
<i>w[*]; P[w⁺, bam-Gal4-VP16]</i>	Chen and McKearin, 2003
<i>w[*]; prd-Gal4/TM3,Sb, P[w⁺, Ubx-lacZ]</i>	Brand and Perrimon, 1993
<i>w[*]; Sb/TM3,Ser</i>	Lindsley and Zimm, 1992
<i>w[*]; Sco/CyO, P[ry⁺, ftz lacZ]</i>	Lindsley and Zimm, 1992
<i>w[*]; Sco/CyO, P[ry⁺, ftz lacZ]; D/TM3,Sb, P[w⁺, Ubx-lacZ]</i>	Lindsley and Zimm, 1992
<i>w[*]; Kr^{lf-1}/CyO; D/TM3,Ser</i>	BDSC Nr.: 7198

Tabelle 6 | Transgene Fliegenstämme

Genotyp	Referenz/ Quelle
<i>w*</i> ; <i>Sco/CyO</i> , <i>P[ry⁺, ftz lacZ]</i> ; <i>Rad21^{ex8}</i> , <i>tubpr<Rad21 (3TEV-271)</i> <i>myc10 (AP360)</i>	Pauli et al., 2008
<i>C(4)RM</i> , <i>ci¹ ey^R/0</i>	BDSC Nr.: 1785
<i>w¹/Dp(1;Y)B^SYy⁺</i>	S. Heidmann, pers. Mitteilung
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, His2Av-mRFP1]III.1</i>	Schuh et al., 2007
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, His2Av-mRFP1]II.2</i>	Schuh et al., 2007
<i>w*</i> ; <i>pBac[w⁺, CapG-EGFP]III.1</i> , <i>P[w⁺, His2Av-mRFP]III.1/TM3,Ser</i>	Herzog et al., 2013
<i>w*</i> ; <i>M[w⁺, EGFP-CapD2]ZH-51D/CyO</i> ; <i>P[w⁺, His2Av-mRFP]III.1/TM3,Sb</i>	S. Heidmann, pers. Mitteilung
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, His2Av-mRFP]II.1</i> ; <i>M[w⁺, gSMC2_h-EGFP]ZH-96E</i>	Herzog et al., 2013
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, UASP-TEV^{SV}]II.1/CyO</i> , <i>P[ry⁺, ftz lacZ]</i>	Urban et al., 2014
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, UASP-NSImb-vhh-GFP4]III.1</i>	Urban et al., 2014
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, UAS-CapG-RNAi 20.2]ZH-96E (UAS-CapG-RNAi)</i>	Häfner, 2012
<i>P{KK101679}VIE-260B (UAS-Barren-RNAi)</i>	VDRC Nr.: 110433
<i>y¹ sc[*] v¹</i> ; <i>P[TRiP.GL00635]attP2/TM3,Sb (UAS-CapH2-RNAi)</i>	BDSC Nr.: 38196
<i>y¹ sc[*] v¹</i> ; <i>P[TRiP.GL00575]attP2 (UAS-CapD3-RNAi)</i>	BDSC Nr.: 36615
<i>y¹ sc[*] v¹</i> ; <i>P[TRiP.HMS00360]attP2 (UAS-SMC2-RNAi)</i>	BDSC Nr.: 32369
<i>y¹ sc[*] v¹</i> ; <i>P[TRiP.GL00202]attP2 (UAS-AuroraB-RNAi)</i>	BDSC Nr.: 35299
<i>y¹ w*</i> <i>M[vas-int.Dm]ZH-2A</i> ; <i>M[3xP3-RFP.attP]ZH-68E</i>	BDSC Nr.: 24485
<i>y¹ w*</i> <i>M[vas-int.Dm]ZH-2A</i> ; <i>M[3xP3-RFP.attP]ZH-86Fb</i>	BDSC Nr.: 24749
<i>y¹,w*</i> <i>M[nos-cas9,w⁺]ZH-2A</i>	BDSC Nr.: 54591

Tabelle 7 | Erzeugte Fliegenstämme

Genotyp	Mutagenese
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, His2Av-mRFP]II.2/CyO</i> ; <i>M[w⁺, Barren-EGFP]ZH-68E/TM3, Ser</i>	φC31-Integrase
<i>w*</i> ; <i>M[w⁺, Barren-TEV¹⁵⁶]ZH-68E/TM3, Ser</i>	φC31-Integrase
<i>w*</i> ; <i>M[w⁺, Barren-TEV⁵⁹¹]ZH-68E/TM3, Ser</i>	φC31-Integrase
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, UASP-Barren-EGFP]/TM3,Ser</i>	P-Element
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, UASP-Barren-EGFP-T43A]/TM3,Ser</i>	P-Element
<i>w*</i> ; <i>M[w⁺, SMC2_h-EGFP-siRNA^{res}]ZH-86Fb/TM3,Ser</i>	φC31-Integrase
<i>w*</i> ; <i>M[w⁺, CapG^{FL}-EGFP-siRNA^{res}]ZH-68E/TM3,Ser</i>	φC31-Integrase
<i>w*</i> ; <i>M[w⁺, Barren-EGFP-siRNA^{res}]ZH-68E/TM3,Ser</i>	φC31-Integrase
<i>w*</i> ; <i>CapG-FSV3FE/CyO</i> , <i>P[ry⁺, ftz lacZ]</i>	CRISPR/Cas

<i>w*</i> ; <i>CapG-FE/CyO</i> , <i>P[ry⁺, ftz lacZ]</i>	CRISPR/Cas
<i>w*</i> ; <i>Barren-FSV3FE/CyO</i> , <i>P[ry⁺, ftz lacZ]</i>	CRISPR/Cas
<i>w*</i> ; <i>Barren-FE/CyO</i> , <i>P[ry⁺, ftz lacZ]</i>	CRISPR/Cas
<i>w*</i> ; <i>P[w⁺, His2Av-mRFP] III.1</i> , <i>P[w⁺, bam-Gal4-VP16]/TM3,Ser</i>	Rekombination
<i>w*</i> ; <i>Df(2L)Exel7077</i> , <i>P[w⁺, UASP-TEV^{SV} II.1]/CyO</i>	Rekombination

Tabelle 8 | Mutante Fliegenstämme

Genotyp	Quelle/Referenz
<i>w</i> ¹	Lindsley and Zimm, 1992
<i>w*</i> ; <i>Df(2L)Exel7077/CyO</i>	BDSC Nr.: 7850
<i>y</i> ¹ <i>w*</i> ; <i>barr</i> ^{L305} / <i>CyO</i>	BDSC Nr.: 4402
<i>solo</i> ^{Z2-0198} / <i>CyO</i>	Yan et al., 2010

4.2.2 Standardmethoden

Die Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgte in Futterröhrchen mit Futtermedium (0,8 % (w/v) Fadenagar; 2,2 % (w/v) Rübensirup; 8 % (w/v) Malzin; 8 % (w/v) Maismehl; 1 % (w/v) Sojamehl; 1,8 % (w/v) Trockenhefe; 0,65 % (v/v) Propionsäure in H₂O) bei 18-25 °C. Jegliche Kreuzungsexperimente wurden wie bei Greenspan, 1997, Roberts, 1998 und Sullivan, 2000 beschrieben, durchgeführt. Spezifische Angaben zur genetischen Nomenklatur sind bei Lindsley and Zimm, 1992 oder in der online verfügbaren Datenbank FlyBase (FlyBase Consortium, 2003) nachzuschlagen.

4.2.3 Allgemeine genetische Methoden im Umgang mit *D. melanogaster*

4.2.3.1 Balancierchromosomen

Um Transgene über vielzählige Generationen hinweg stabil vererben zu können und zu verhindern, dass zusammengekreuzte Allelkombinationen durch Rekombination verloren gehen, werden in der *D. melanogaster*-Genetik Balancierchromosomen eingesetzt. Diese sind durch invertierte Sequenzbereiche gekennzeichnet, wodurch die Rekombination und der Austausch von Genen zwischen den homologen Chromosomen weitgehend unterbunden wird. Rezessive Letalmutationen verhindern zudem, dass die Balancierchromosomen selbst homozygot etabliert werden können. Balancierchromosomen tragen dominante Markermutationen, welche meist bestimmte Körpermerkmale betreffen und können somit phänotypisch sichtbar gemacht werden. Um eine einheitliche Terminologie und eindeutige chromosomale Zuordnung zu gewährleisten, werden Balancierchromosomen mit Kurzbezeichnungen wie *CyO* (*Curly of Oster*) und *TM3* (*Third multiple #3*) und den auf ihnen befindliche Markermutationen, z. B. *Sb* (*Stubble*) und *Ser* (*Serrate*) bezeichnet. Für Kreuzungsexperimente in der vorliegenden Arbeit wurden die zweitchromosomalen Balancierchromosomen *CyO* und die drittchromosomalen

Balancierchromosomen *TM3*, *Sb* sowie *TM3*, *Ser* verwendet. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Balancierchromosomen können FlyBase entnommen werden.

4.2.3.2 Keimbahntransformation von *D. melanogaster*-Embryonen durch Mikroinjektion und anschließende Kartierung von Transgeninsertionen

Für die Erzeugung transgener Fliegenstämme wurden die P-Element-vermittelte und die ϕ C31-vermittelte Keimbahntransformation verwendet. Beide Methoden beruhen auf der Mikroinjektion von Plasmid-DNA in den posterioren Pol syncytialer *D. melanogaster*-Embryonen, wo sich die Vorläufer der späteren Keimbahnzellen befinden. Die Injektion in dieses Gewebe gewährleistet eine Vererbung der eingeführten DNA-Sequenz an die Nachkommenschaft und somit die Etablierung transgener Fliegenstämme. Detaillierte Angaben zu den Mikroinjektionsversuchen finden sich bei Herzig, 1999. Für die Herstellung der Injektionslösung wurden 12 μ g der jeweiligen Plasmid-DNA sowie (bei P-Element vermittelter Keimbahntransformation) 4 μ g des für die Δ 2-3 Transposase kodierenden Plasmids in 100 μ L H₂O aufgenommen und zusätzlich mit 10 μ L 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 μ L Ethanol versetzt. Nach Fällung der DNA für mindestens 15 min bei -70 °C wurde diese durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ L sterilfiltriertem Injektionspuffer (0,1 mM NaP, 5 mM KCl; pH 6,8) aufgenommen. Die Injektion erfolgte mit der Injektionsapparatur *FemtoJet* der Firma Eppendorf oder *Pressure Injection System Accessories* (Harvard Apparatus).

P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

Das System der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation (Spradling and Rubin, 1982) erlaubt die Integration gewünschter DNA-Sequenzen an einen zufälligen *Locus* im Genom und beruht auf bei *D. melanogaster* natürlich vorkommenden transposablen Elementen. Bei der Verwendung dieses Systems zur Erzeugung transgener Individuen wird eine Mischung aus zwei Plasmiden in syncytiale Embryonen injiziert. Eines der beiden Plasmide trägt die für das Transgen kodierende Sequenz flankiert von funktionellen P-Element-Enden, welche durch charakteristische gegenläufige Wiederholungssequenzen (*inverted repeats*) gekennzeichnet sind (Beall and Rio, 1997). Darüber hinaus verfügt das Transgen-tragende Plasmid über ein Markergen (*white*⁺), welches die Selektion positiver Transgeninsertionen über die Augenfarbe ermöglicht. Das zweite Plasmid kodiert für eine modifizierte Form der Transposase (Δ 2-3), welche das rekombinante P-Element über spezifische Erkennungssequenzen erkennt und schließlich dessen Transposition und Integration in das Fliegen-genom bewirkt. Die zufällige Integration des Transgens in das Genom erfordert eine anschließende Lokalisation der Transgeninsertion durch Kartierungsexperimente. Kartierung sowie Etablierung transgener Fliegenstämme erfolgte wie bei Kramer, 1999 beschrieben.

ϕ C31-vermittelte Integration

Das ϕ C31 Integrase-System (Bischof et al., 2007; Groth et al., 2004) ermöglicht eine orts- bzw. sequenzspezifische Integration des Transgens in das Fliegen-genom. Dieses System basiert ursprünglich auf einem Mechanismus des Bakteriophagen ϕ C31 zur Integration der

Phagen-DNA in das Wirtsgenom, bei dem eine ortsspezifische, unidirektionale Rekombination zwischen der im Phagengenom vorkommenden *attachment-site* (attP) und der im Bakteriengenom befindlichen *attachment-site* (attB) stattfindet. Die Rekombination beruht dabei auf der Aktivität einer sequenzspezifischen Phagen Rekombinase, der ϕ C31 Integrase (Thorpe et al., 2000). Um das System für die Veränderung des Genoms in *D. melanogaster* nutzbar zu machen, wurden diverse Fliegenlinien etabliert, die attP-Sequenzen an verschiedenen Positionen im Genom aufweisen. Gleichzeitig besitzen diese Fliegen die kodierende Sequenz für die Integrase unter Kontrolle des Promotors *vasa*, der eine keimzellspezifische Expression gewährleistet (Bischof et al., 2007). Durch Mikroinjektion von Plasmiden, welche neben der zu integrierenden Gensequenz sowie einem Markergen (*white*⁺) die *attachment-site* attB tragen, kann eine ortsspezifische Integration in das Fliegen-genom erzielt werden. Eine erfolgreiche Integration kann über die durch das *white*⁺-Gen hervorgerufene Rotfärbung der Augen nachgewiesen werden.

4.2.3.3 Gal4/UAS-System

Mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems (Brand and Perrimon, 1993) können beliebige Gene in *D. melanogaster* zeit- und gewebespezifisch exprimiert werden. Die Gal4/UAS-abhängige Genexpression erfordert das Vorhandensein zweier Komponenten: Ein *GAL4*-Transgen und ein *UAS*-Transgen. Die Aktivierung des Systems erfolgt durch Kreuzung der sogenannten Treiberlinie mit einer entsprechenden Responderlinie. Die Treiberlinie kodiert für den hefespezifischen Transkriptionsfaktor Gal4 unter Kontrolle eines stadien- oder gewebespezifischen nativen Promotors. Die Responderlinie besitzt eine Gal4-Bindungsstelle (*UAS*-Sequenz) mit *downstream* gelegener kodierender Sequenz des Zielgens. Nachkommen, die aus dieser Kreuzung hervorgehen, exprimieren den Transkriptionsfaktor Gal4, der an die *UAS*-Sequenz bindet und dadurch die Expression des Zielgens induziert. Da *D. melanogaster* selbst keine Zielgene für eine Gal4-abhängige Expression besitzt und die *UAS*-Sequenz von *Drosophila*-spezifischen Transkriptionsfaktoren nicht erkannt wird, haben die Einzelkomponenten keine Auswirkung auf die Genexpression.

4.2.3.4 RNA-Interferenz in *D. melanogaster*

Die Methode der RNA-Interferenz ermöglicht die gezielte und spezifische Herunterregulation bzw. Inaktivierung von Genen auf posttranskriptionaler Ebene durch Abbau deren spezifischer mRNAs. Für den RNAi-vermittelten Abbau in *D. melanogaster* werden spezielle RNAi-Konstrukte unter Kontrolle des Gal4/UAS-Systems exprimiert. Zu diesem Zweck wurden jeweils jungfräuliche Weibchen der UAS-RNAi-Linien mit Männchen einer gewebespezifischen Treiberlinie verpaart. Die Kreuzung der Fliegen erfolgte stets bei 25 °C. Die für die RNA-Interferenz in *D. melanogaster* verwendeten RNAi Linien exprimieren entweder lange *hairpin* RNAs (dsRNA) (Dietzl et al., 2007) oder kurze *short hairpin* RNAs (shRNA), welche auf der Basis endogener microRNAs (miRNA) beruhen und durch kurze *inverted repeat* Bereiche eines Genfragments (60-70 bp) gekennzeichnet sind (Ni et al., 2011).

4.2.3.5 DeGradFP (*Degrade green fluorescent protein*)-System

Das DeGradFP-System ist eine Methode zur direkten, zielgerichteten Depletion EGFP-markierter Fusionsproteine und basiert auf dem ubiquitinabhängigen, proteasomalen Proteinabbauweg (Causinus et al., 2011). Der SCF-Komplex (Skp1, Cullin, F-Box Protein), eine Multi-Protein E3 Ubiquitin-Ligase, katalysiert die Ubiquitinierung der Zielproteine und markiert diese für den proteasomalen Abbau. Die Substratspezifität wird dabei durch verschiedene Protein-Protein-Interaktionsmotive des F-Box-Proteins vermittelt. Als F-Box-Protein fungiert beim DeGrad-FP-System ein sogenannter GFP-*nanobody* bestehend aus der F-Box Domäne von Nslmb, einem F-Box-Protein aus *D. melanogaster* (Jiang and Struhl, 1998) in Fusion mit einem *single-domain* Antikörperfragment vhhGFP4 (Saerens et al., 2005). VhhGFP4 erkennt GFP, Venus, YFP sowie *enhanced* GFP (EGFP). Bei der Anwendung in *D. melanogaster* wird der GFP *nanobody* Nslmb-vhhGFP4 unter Kontrolle des Gal4/UAS-Systems exprimiert und ermöglicht somit einen zeit- oder gewebespezifischen Abbau EGFP-markierter Proteine.

4.2.3.6 TEV-Protease-System

Das TEV-Protease-System wird in der Molekularbiologie verwendet, um Proteine durch gezielte Proteolyse zu inaktivieren. Es basiert auf der Aktivität einer viralen Cysteinpeptidase der pflanzenpathogenen Potyviren (Carrington et al., 1989; Phan et al., 2002). Bei dieser handelt es sich um die 27 kDa große katalytische Domäne des *nuclear inclusion a*-Proteins (Nla) aus dem Tabakäzvirus (*Tobacco Etch Virus*, TEV). Die TEV-Protease zeichnet sich durch eine stringente Sequenzspezifität aus und erkennt lineare Epitope mit der sieben Aminosäuren umfassenden Sequenz EXXYXQ(G/S), welche zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin bzw. Serin hydrolysiert werden. Zwar werden an den Positionen X unterschiedliche Aminosäuren toleriert, die höchste Spalteffizienz liefern jedoch Sequenzen der Form ENLYFQS (Carrington and Dougherty, 1988; Dougherty and Parks, 1991). Zur gezielten Inaktivierung von Proteinen muss die Erkennungssequenz für die TEV-Protease an geeigneter Position in die für das Zielprotein kodierende Sequenz integriert werden. Um eine möglichst hohe Spalteffizienz zu erzielen, wurde eine modifizierte Version der TEV-Protease, TEV^{S219V}, etabliert. Diese Variante ist durch einen Aminosäureaustausch innerhalb der Autoproteolyseschnittstelle gekennzeichnet und weist infolgedessen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Autoinaktivierung und gleichzeitig eine gesteigerte Aktivität auf (Kapust et al., 2001). Zur Anwendung *in vivo* wurden transgene Fliegenlinien verwendet mit welchen die TEV-Protease konditionell über das Gal4/UAS-System exprimiert werden kann.

4.2.3.7 Flp/FRT-System

Das Flp/FRT-System kann in *D. melanogaster* verwendet werden, um DNA-Sequenzen ortsspezifisch zu manipulieren. Es beruht auf der Flp-Rekombinase (Flippase)-vermittelten Rekombination zwischen jeweils zwei artifiziell eingefügten FRT (*flippase recombinase target*)-Sequenzen. Durch die Orientierung der beiden FRT-Sequenzen kann der Mechanismus der Rekombination gezielt beeinflusst werden. Bei Vorliegen der beiden FRT-Sequenzen in gleicher Orientierung kommt es zur Deletion des dazwischenliegenden Sequenzbereichs im Rahmen der Rekombination (Golic and Lindquist, 1989). Die

rekombinationsabhängige Excision der von FRT-sites flankierten 3xP3 (F3F) bzw. SV40-3xP3 (FSV3F) Kassetten erfolgte durch Injektion von Flp mRNA in syncytiale Embryonen des entsprechenden Genotyps. Einzelne aus der Mikroinjektion hervorgegangene Mosaik-Männchen wurden mit jeweils drei jungfräulichen w^* ; *Sco/CyO*, *P[ry⁺, ftz lacZ]* Weibchen verkreuzt, um die modifizierten Alle zu isolieren und an die nächste Generation zu übertragen.

4.2.3.8 Männlicher Fertilitätstest

Um männliche Individuen eines designierten Genotyps auf ihre Fertilität hin zu überprüfen, wurde ein Fertilitätstest durchgeführt. Hierfür wurden 2-4 Tage alte Männchen des zu untersuchenden Genotyps mit 5-12 Tage alten wildtypischen, jungfräulichen Weibchen gekreuzt. Es wurden jeweils 3 Weibchen mit einem einzelnen Männchen in einem behefteten Futterröhrchen verpaart. Nach 4 Tagen wurden die Weibchen entnommen und in ein frisches beheftetes Futterröhrchen überführt. Die Weibchen wurden nun für weitere 4 Tage zur Eiablage in dem Futterröhrchen gehalten. Schließlich wurden die Weibchen aus dem Futterröhrchen entfernt und das Röhrchen inkubiert, um eine Entwicklung der Embryonen zu gewährleisten. Nach dem Schlüpfen der ersten Individuen wurden sämtliche Nachkommen über einen Zeitraum von 10 Tagen gezählt. Die Haltung sowie Kreuzung der Fliegen erfolgte permanent bei 25 °C. Pro Genotyp wurden jeweils 10 Männchen auf ihre Fertilität untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte durch *unpaired student's t-test* (www.graphpad.com).

4.2.3.9 Nondisjunction-Analyse

Nondisjunction Tests sind genetische Analysen um zu bestimmen, ob Männchen eines bestimmten Genotyps eine erhöhte Anzahl aneuploider Spermien produzieren.

Um die Segregation des IV. Chromosoms verfolgen zu können, wurden etwa 20 2-3 Tage alte Männchen des zu untersuchenden Genotyps mit etwa 30 jungfräulichen Weibchen des Genotyps *C(4)RM*, *ci¹*, *ey^R/0* (Abb. 31) verpaart und bei 25 °C gehalten. Die Elterntiere wurden dabei im Abstand von drei Tagen in neue Futtergefäße überführt. Nach beginnendem Schlüpfen der Nachkommen wurden diese täglich ausgezählt. Die für den *Nondisjunction* Test herangezogenen Weibchen tragen ein sogenanntes „Compound Chromosom“, d. h. die beiden homologen IV. Chromosomen sind über bestimmte Genombereiche miteinander fusioniert und können nicht mehr getrennt voneinander segregiert werden (Abb. 31). Durch die auf dem *Compound* Chromosom befindliche rezessive Mutation *ey^R* kann die Fertilisation mit aneuploiden Spermien identifiziert werden. Durch die Befruchtung von *C(4)RM*, *ci¹*, *ey^R*-Oocyten mit nullo-IV Spermien kommt es zur phänotypischen Ausprägung von *ey^R*, was sich in einer veränderten Augenmorphologie der Nachkommen äußert.

Für X-Y *Nondisjunction* Analysen wurden Männchen durch konsequente Kreuzung generiert, die neben dem keimbahnspezifischen Treibertransgen *bam-Gal4-VP16* und dem jeweiligen UAS-RNAi-Transgen ein modifiziertes Y-Chromosom (*Dp(1;Y)B^SYy⁺*) (Abb. 31) tragen. 20 Männchen des angegebenen Genotyps wurden mit etwa 30 jungfräulichen w^1 -Weibchen wie oben verpaart. Die Transmission des Y-Chromosoms lässt sich anhand der auf ihm

befindlichen dominanten Markermutation B^S verfolgen (Abb. 31). Das Auftreten von Männchen mit wildtypisch erscheinenden Augen (X0) oder Weibchen mit B^S Augen ($XXDp(1;Y)B^SYy^+$) repräsentiert *Nondisjunction*-Ereignisse des X-Y Paares.

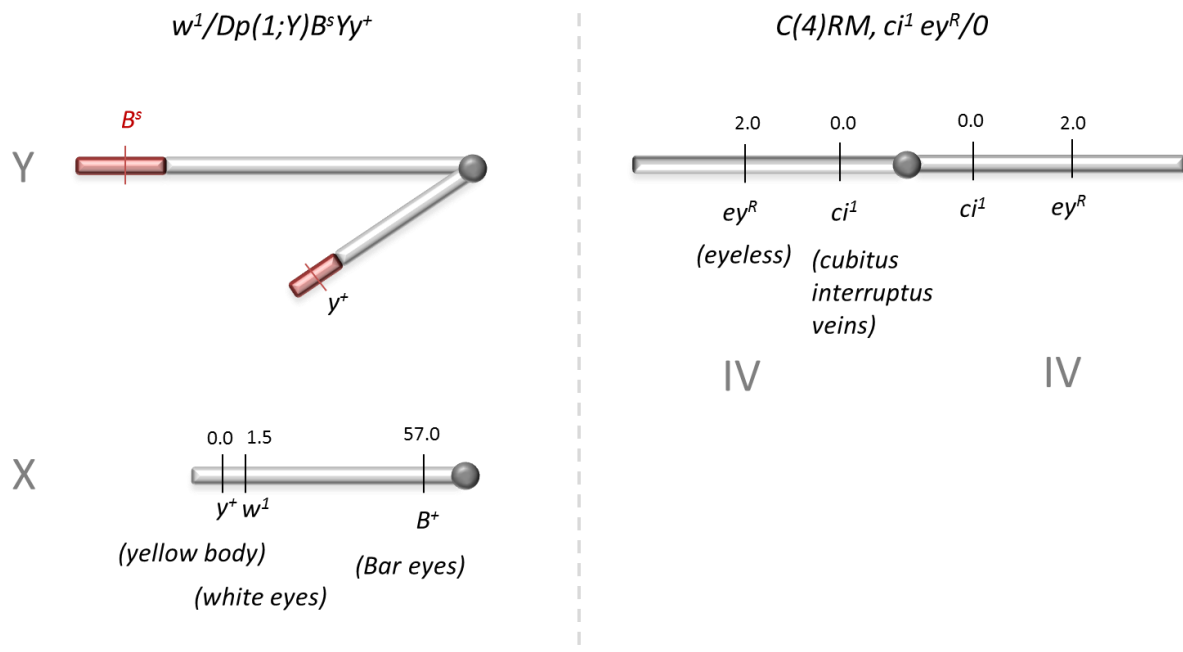


Abbildung 31 | Genkarte der für die *Nondisjunction*-Analysen verwendeten Chromosomen $Dp(1;Y)B^SYy^+$ und $C(4)RM, ci^1 ey^R$. Abgebildet sind die Geschlechtschromosomen (X und Y) des Genotyps $w^1/Dp(1;Y)B^SYy^+$ (links) sowie die IV. Chromosomen des Genotyps $C(4)RM, ci^1 ey^R/0$ (rechts) mit allen relevanten Modifikationen. Die Positionen relevanter Markermutationen sind durch die Gennamen (unten) und ihren relativen genetischen Abstand in centiMorgan (oben) gekennzeichnet. Links: Männchen des Genotyps $w^1/Dp(1;Y)B^SYy^+$ tragen ein Y-Chromosom mit der Duplikation eines Genabschnitts des X-Chromosoms mit der Mutation B^S am Terminus des langen Arms sowie der Duplikation eines Genabschnitts des X-Chromosoms mit dem wildtypischen y^+ -Gen am Terminus des kurzen Arms. Das X-Chromosom trägt wildtypische Allele der Gene y und B sowie eine Mutation im Genlocus für w . Die Präsenz des Y-Chromosoms wird folglich durch die Ausprägung der dominanten Markermutation B^S indiziert. Rechts: Beide IV. Chromosomen sind am Centromer miteinander fusioniert (RM = *reversed metacentric*) und tragen die Mutationen ey^R und ci^1 . ci^1 und y^+ wurden bei der Auswertung des *Nondisjunction*-Tests nicht berücksichtigt.

4.2.4 Spezielle Methoden im Umgang mit *D. melanogaster*

4.2.4.1 Primärkultur von isolierten *D. melanogaster*-Spermatozyten

Um die Progression der meiotischen Teilungen auf chromosomaler Ebene in Echtzeit verfolgen zu können, wurden intakte Zysten aus *D. melanogaster*-Hoden isoliert und kultiviert. Männliche Larven des dritten Larvalstadiums wurden anhand der im hinteren Larvendrittel liegenden und nach außen hin sichtbaren, linsenförmigen Hoden vorsortiert und anschließend in einem Futterröhrchen bei 18 °C bzw. 25 °C gehalten. Für die Isolierung

intakter pupaler Hoden wurden 1-2 Tage alte Puppen von der Gefäßwand abgenommen und in einen Tropfen aus Kulturmedium (M3 Insektenkulturmedium ohne Kalziumcarbonat; 10 % (v/v) fetales Rinderserum; 100 µg/mL Streptomycin; 100 U/mL Penicillin) auf einem sterilen Objektträger mit Vertiefung überführt. Anschließend wurde die Puppenhülle anterior geöffnet und die Hülle vorsichtig bis zur Hälfte abgetragen. Die Puppe wurde dann großflächig weiter geöffnet und die bohnenförmig erscheinenden pupalen Hoden vorsichtig freipräpariert und mit Hilfe einer Pinzette in eine Glasbodenschale (µ-Dish von ibidi; Art. Nr.: 81158) mit frischem Kulturmedium überführt. Für die Isolierung der Zysten wurde die Hülle des Hodens mit zwei feinen Stahlnadeln (Insektennadeln) geöffnet und die austretenden Zysten anschließend vorsichtig vereinzelt. Die Kultivierung und Mikroskopie der Zysten erfolgte in 8-*well* Kulturschalen (µ-Slide 8 well von ibidi; Art.Nr.: 80826). Hierfür wurden die Zysten jeweils zweier Hoden mit einer Glaspipette in eine Kammer mit frischem Kulturmedium überführt. Um die Bewegung der Zysten in der Probe zu reduzieren wurden in jedes *well* 1-2 Tropfen 1% (v/v) Methylcellulose pipettiert.

4.2.4.2 Inhibitorbehandlung von kultivierten Spermatozyten

Für die Behandlung der Zysten mit dem Aurora B Inhibitor Binuclein 2 (Sigma Aldrich) wurde dem Kulturmedium unmittelbar vor Beginn der Präparation 50 µM Binuclein 2 (gelöst in DMSO) zugegeben. Vor Beginn der Mikroskopie wurden die isolierten Zysten in den 8-*well* Kulturschalen mindestens 1 h lang in Kulturmedium mit Binuclein 2 inkubiert, um eine ausreichende Diffusion des Inhibitors durch die Zystenmembran und somit eine effiziente Wirksamkeit zu gewährleisten.

4.2.4.3 Präparation von Hoden und Ovarien aus adulten *D. melanogaster*-Fliegen

Für die Präparation von Hoden sowie Ovarien wurden adulte Individuen zunächst mit CO₂ betäubt und auf einen Objektträger mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) überführt. Mit Hilfe zweier Pinzetten wurde das Abdomen geöffnet und die weiblichen bzw. männlichen Reproduktionsorgane unter dem Binokular vorsichtig freipräpariert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden diese in PBS auf Eis gelagert.

4.2.4.4 Präparation von Samenblasen aus adulten *D. melanogaster*-Männchen

Männchen wurden in beheften Futterröhrchen getrennt von Weibchen 10 Tage lang gehalten, um zu gewährleisten, dass sich die produzierten Spermien in den Samenblasen anreichern. Anschließend wurden die Samenblasen in PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) präpariert, fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt.

4.2.4.5 Embryonenkollektion

Für Immunfluoreszenzanalysen sowie für die Herstellung von Proteinextrakten aus Embryonen wurden zunächst zeitlich definierte Embryonenkollektionen durchgeführt. Hierfür wurden adulte Fliegen in Flugkäfigen bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C gehalten. Die Flugkäfige wurden mit Apfelsaftagarplatten (1,4 % (w/v) Agar; 0,12 % Nipagin; 2 % (w/v) Saccharose; 20 % (v/v) Apfelsaft) verschlossen, die mit etwas Hefesuspension bestrichen wurden. Vor der Embryonenkollektion wurde zunächst eine einstündige Vorkollektion durchgeführt. Diese diente dem Ablegen von zurückgehaltenen Embryonen,

die sich im Weibchen bereits vor der Eiablage entwickeln und in ihrer Entwicklung nicht synchron sind. Für die eigentliche Embryonenkollektion wurde das Kollektionsgefäß schließlich auf eine frische, temperierte Apfelsaftagarplatte überführt und bei 25 °C inkubiert. Nach einem definierten Zeitraum wurde die Apfelsaftagarplatte vom Kollektionsgefäß entfernt und die abgelegten Eier bei 25 °C weiter inkubiert, um die Alterung und entsprechende Entwicklung der Embryonen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Embryonen mit NaCl-Tx (0,7 % (w/v) NaCl; 0,07 % (w/v) Triton-X-100) von der Apfelsaftagarplatte gewaschen. Nach dreiminütiger Dechorionisierung mit 50 % (v/v) Klorix (Colgate Palmolive GmbH) wurden die Embryonen nochmals ausgiebig mit NaCl-Tx gespült und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

4.2.4.6 Herstellung von Proteinextrakten aus *D. melanogaster*-Gewebe

Für die Herstellung von Proteinextrakten aus adulten *D. melanogaster*-Ovarien wurden diese zunächst wie unter 4.2.4.4 beschrieben präpariert. Überschüssiges PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) wurde quantitativ abgenommen und das Gewebe in einem definierten Volumen an Gelauftragspuffer (0,15 M Tris-HCl, pH 6,8; 6 % (w/v) SDS; 0,3 M β -Mercaptoethanol; 30 % (v/v) Glycerin; 0,3 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Das Volumen an Gelauftragspuffer wurde dabei so gewählt, dass eine Endkonzentration von 1 Ovar/5 μ L Gelauftragspuffer erreicht wurde. Schließlich wurde das Gewebe mit dem Pistill homogenisiert, 5 min bei 95°C zur Denaturierung der Proteine gekocht und kurz abzentrifugiert.

Für die Erzeugung von Proteinextrakten aus adulten *D. melanogaster*-Hoden wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 μ L Gelauftragspuffer vorgelegt. Jeweils 10 Hoden wurden präpariert, direkt in den Gelauftragspuffer transferiert und anschließend homogenisiert. Da aufgrund des geringen Volumens des Proteinextrakts beim Herausnehmen des Pistills aus dem Reaktionsgefäß ein beträchtlicher Anteil des Extrakts dem Pistill anhaftet, wurde in den Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes mit Pistill mit Hilfe einer Kanüle ein Loch gebohrt und das Gefäß in ein zweites Reaktionsgefäß gestellt. Anschließend wurde der Proteinextrakt durch Zentrifugation (3 min, 2500 rpm, Universal 16 A von Hettich Zentrifugen) quantitativ in das untere Reaktionsgefäß überführt und denaturiert.

4.2.4.7 Immunfluoreszenzfärbung von adulten *D. melanogaster*-Hoden

Nach der Präparation wurden die Hoden zur Fixierung in ein Gemisch aus 300 μ L Heptan und 150 μ L Fixierlösung (2 % PFA; 0,5 % NP40 in PBS) überführt und 20 min unter Rotation inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-Tween (0,2 % Tween 20 in PBS) erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen mit 10 % FBS (v/v) in PBS-Tween eine Stunde lang unter Rotation und im Anschluss daran die Inkubation mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung in 10 % FBS (v/v) in PBS-Tween über Nacht bei 4 °C. Durch dreimaliges Waschen der Hoden jeweils 10 min lang mit PBS-Tween sollten die überschüssigen Antikörper entfernt werden. Anschließend wurden die Hoden für weitere 2 Stunden mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in 10 % FBS (v/v) in PBS-Tween) behandelt und erneut dreimal mit 10 % FBS (v/v) in PBS-Tween gewaschen. Schließlich

erfolgte die Färbung der DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258. Hierzu wurden die Hoden 5 min lang mit DNA-Färbelösung (1 µg Hoechst 33258/mL in PBS) unter Rotation inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Hoden auf einen Objektträger transferiert und überschüssiges PBS vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Die Hoden wurden mit Montiermedium (70 % Glycerin; 50 mM Tris/HCl pH 9,5; 10 mg/mL Propylgallat; 0,5 mg/mL p-Phenylendiamin in PBS) überschichtet und mit einem Deckglas fixiert.

4.2.4.8 Quetschpräparate von adulten *D. melanogaster*-Hoden mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung

Nach Präparation aus jungen, adulten Männchen wurden jeweils 4-6 Hoden in einen Tropfen PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) auf einem mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger transferiert und ein Deckglas (24x36 mm) aufgelegt. Zum Quetschen der Hoden wurden vier Lagen Zellstoff auf das Deckglas gelegt und für etwa 8 Sekunden mit der flachen Handfläche vorsichtig auf das Präparat gedrückt. Anschließend wurde das Präparat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Deckglas mit einem Skalpell abgesprengt. Danach wurde der Objektträger in eine Glasküvette gestellt und für mindestens 10 min in 95 % (v/v) Ethanol bei -20 °C entwässert. Zum Fixieren der Präparate wurden diese kurz auf Zellstoff abgetupft und mit etwa 1 mL Fixativ (4 % PFA in PBS) 10 min lang überschichtet. Nach Abgießen des Fixativs wurden die Objektträger in einer Glasküvette zunächst zweimal 15 min mit PBST (0,3 % (w/v) Triton X-100 in PBS) und einmal 15 min mit PBT (0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS) gewaschen. Das Blockieren unspezifischer Antikörperbindestellen erfolgte über einen Zeitraum von 30 min in PBT/BSA (3 % (w/v) BSA in PBT). Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Präparate in eine lichtundurchlässige, mit feuchtem Zellstoff ausgelegte Kammer gelegt. Der entsprechende Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung in PBT/BSA eingesetzt, auf das Präparat getropft (ca. 60 µL) und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Präparate in der Glasküvette viermal 15 min mit PBT/BSA gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte analog der primären Antikörperfärbung, jedoch für 2 Stunden bei RT. Nach erneutem viermaligem Waschen der Präparate für 15 min in PBT/BSA wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258 gefärbt. Hierfür wurden die Präparate mit 60 µL Färbelösung (1 µg/mL Hoechst 33258 in PBS) überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und 20 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Schließlich wurden die Objektträger viermal 15 min in der Glasküvette mit PBS gewaschen. Das Einbetten der Präparate erfolgte mit Fluoromount G Medium (Southern Biotech). Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Präparate bei 4 °C gelagert.

4.2.4.9 Quetschpräparate von adulten *D. melanogaster*-Hoden mit anschließender Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die aus adulten Männchen präparierten Hoden wurden in einen Tropfen 0,5 % Natriumcitrat auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger überführt und 10 min lang inkubiert. Die Natriumcitratlösung wurde vorsichtig abgesaugt und die Hoden mit 45 % Essigsäure/2 % Paraformaldehyd überschichtet und 3 min lang fixiert. Danach wurde vorsichtig ein

silikonbeschichtetes Deckglas aufgelegt und die Hoden gequetscht (siehe 4.2.4.7), in flüssigem Stickstoff gefroren und das Deckglas abgesprengt. Die Präparate wurden zweimal 10 min mit 70 % (v/v) Ethanol und einmal 10 min mit 100 % Ethanol entwässert und anschließend luftgetrocknet. Es folgten mehrere Waschschrte mit kontinuierlicher Steigerung der Formamid-Konzentration. Es wurde nacheinander jeweils 10 min mit 2 x SSCT (0,3 M Natriumchlorid; 30 mM Natriumcitrat; 0,1 % (v/v) Tween 20); 2 x SSCT/25 % Formamid und 2 x SSCT/50 % Formamid gewaschen. Die Präparate wurden dazu auf ein Zellstoffpapier gelegt und mit 500 µL der jeweiligen Waschlösung überschichtet. Danach wurden die Präparate für weitere 3 h mit 2 x SSCT/50 % Formamid prähybridisiert. Für die Hybridisierungslösung wurden 36 µL Hybridisierungspuffer (20 % Dextransulfat; 15 % Formamid in 2x SSCT) mit 2 µL DNA-Sonde und 2 µL H₂O versetzt. Die Hybridisierungslösung wurde auf die Objektträger pipettiert, ein Deckglas aufgelegt und in einem Aluminiumheizblock mit Deckel 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde das Deckglas entfernt und die Präparate insgesamt dreimal 1 h mit 2 x SSCT/50 % Formamid gewaschen. Nach weiteren Waschschrten mit 2 x SSCT/25 % Formamid, 2 x SSCT und PBS für jeweils 10 min erfolgte die Färbung der DNA mit Hoechst 33258 und das Montieren und Fixieren der Präparate (siehe 4.2.4.7).

4.2.4.10 Herstellung von DNA-Sonden für FISH

Um eine für das X-Chromosom spezifische DNA-Sonde zu erzeugen, wurde eine sich mehrfach wiederholende, 359 bp lange Satellitensequenz zwischen Centromer und dem rDNA-Locus ausgewählt. Zunächst wurde der entsprechende Sequenzbereich mit flankierenden Oligonukleotiden (*forward*: CGGTCATCAAATAATCATTTATTTTGC; *reverse*: CGAAATTTGGAAAAACAGACTCTGC) amplifiziert (Hsieh and Brutlag, 1979), das resultierende PCR-Produkt über Nacht mit den Restriktionsendonukleasen AluI, HaeIII, MseI, RsaI und Sau3AI hydrolysiert und die Spaltprodukte am nächsten Tag präzipitiert. Dazu wurden dem Reaktionsansatz nach Hydrolyse 1/10 des Volumens Natriumacetat, das 2,5-fache Volumen kalten Ethanols sowie 1 µL einer 20 mg/ml Glycogen-Lösung zugegeben und 1 h bei -80 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13000 rpm, 30 min, 4 °C) präzipitiert und das entstandene DNA-Pellet zunächst mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Präzipitat wurde in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen (etwa 10 µg DNA in 36 µL H₂O). Um einzelsträngige DNA-Moleküle zu generieren, erfolgte eine einminütige Denaturierung der DNA bei 100 °C und unmittelbares Abkühlen auf Eis. Um die einzelsträngigen Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren zu können, müssen an die freien Enden zunächst reaktive Gruppen in Form von Amino-Allyl-dUTP angehängt werden. Dies erfolgte in einer durch die Terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase katalysierten Reaktion. Die einzelsträngige DNA wurde mit 200 mM Na-Cacodylat (pH 7,2); 100 mM DTT; 1 mM CoCl₂; 50 mM 5-(3-aminoallyl)-dUTP (*ARES DNA Alexa Fluor 555/647 labeling kit*, Molecular probes), 50 mM unmarkierten dTTP und 400 U Terminaler Desoxyribonukleotidyl-Transferase (Roche) versetzt. Die Reaktion wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und schließlich durch Zugabe von 5 mM EDTA abgestoppt. Anschließend wurde die markierte DNA erneut mit Ethanol präzipitiert (siehe oben) und in 11 µL H₂O resuspendiert. Die Kopplung mit den Farbstoffen (Alexa 555

oder 647) erfolgte gemäß den Angaben des *ARES DNA Alexa Fluor 555/647 labeling kits* (Molecular probes). Im Anschluss an die Kopplungsreaktion wurde die DNA-Sonde mit Hilfe des *GeneJET PCR Purification Kits* von Thermo Scientific gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und das gefärbte DNA-Pellet in Elutionspuffer (aus *GeneJET PCR Purification Kit* von Thermo Scientific) zu etwa 100 ng/μL aufgenommen. Die hergestellten FISH-Sonden können bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

4.2.4.11 Isolation genomischer DNA aus adulten Fliegen

Für die Präparation von genomischer DNA wurden zunächst fünf Fliegen des gewünschten Genotyps in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mindestens 20 min lang bei -20 °C eingefroren. Es wurden zunächst 33 μL Puffer A (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5 % (w/v) SDS) zugegeben und die Fliegen mit dem Pistill homogenisiert. Nach Zugabe weiterer 33 μL Puffer A wurde so lange weiter gemahlen bis nur noch Kutikulareste übrig waren. Das Homogenisat wurde 30 min lang bei 65 °C inkubiert und anschließend 150 μL einer frischen LiCl/KAc-Lösung (1,4 M KAc; 4,3 M LiCl) hinzugegeben. Danach wurde mindestens 10 min lang im Eisbad inkubiert und 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13000 rpm). 150 μL des Überstandes wurden, möglichst ohne Gewebstücke, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällern der Nukleinsäuren wurden 150 μL Isopropanol zugegeben, gut gemischt und erneut 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die DNA zu präzipitieren (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13000 rpm). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Präzipitat mit 1 mL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation wurde der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet im Reaktionsgefäß etwa 10 min lang bei 37 °C getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 15 μL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen. Durch leichtes Erwärmen für 15 min bei 37 °C wird das Lösen der DNA erleichtert. Mit der verwendeten Methode lassen sich DNA-Konzentrationen von 10-20 ng/μL erzielen.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung sämtlicher Proteine erfolgte mit Hilfe 8-17 %-iger SDS-Polyacrylamidgradientengele. Die Elektrophorese erfolgte in Hoefer SE250 Gelkammern bei 120-180 V in Laufpuffer (25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS). Als Molekulargewichtsstandard diente der *Prestained PageRuler Protein ladder* (10-170 kDa) von Thermo Scientific. Sämtliche Proteinproben wurden vor Beladen des Gels in Gelauftragspuffer (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; 6 % (w/v) SDS; 0,3 M β-Mercaptoethanol; 30 % (v/v) Glycerin; 0,3 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D, 13000 rpm, 1 min).

4.3.2 Coomassie Färbung

Zur direkten Visualisierung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurden diese für 1 h in Färbelösung (605 mM (NH₄)₂SO₄; 9,6 % (v/v) H₃PO₄; 1 mM Coomassie-Brillant-Blau G-250; unmittelbar vor Benutzung: 20 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Anschließend wurde das Gel

mit H₂O so lange entfärbt bis der gewünschte Kontrast erreicht war. Das H₂O wurde dabei mehrmals gewechselt.

4.3.3 Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von 6xHis-dSCC1 sowie 6xHis-EGFP wurden die entsprechenden Expressionsplasmide (pQE30-dSCC1 bzw. pQE30-EGFP) zunächst in den Expressionsstamm *E. coli* XL1-Blue transformiert. Von je einer transformierten Einzelkolonie wurde eine Vorkultur mit 6 mL LB-Medium (1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl) mit Ampicillin (100 µg/mL) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Ausgehend davon wurden für die eigentliche Expressionskultur am nächsten Tag 200 mL frischen LB-Mediums mit Ampicillin beimpft. Die Expressionskultur wurde ebenfalls im Schüttelinkubator bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,4-0,6 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Messung der Optischen Dichte wurde mit dem Photometer *OD600 DiluPhotometer* von IMPLLEN durchgeführt. Die bakterielle Expression erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt vier Stunden. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (Heraeus, 4000 rpm, 4 °C, 15 min) sedimentiert und das Bakterienpellet in 20 mL sterilfiltriertem Puffer A (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; pH 8,0) resuspendiert.

4.3.4 Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose

Für die Reinigung von Antikörpern aus einem Immunserum wurden die spezifischen Antigene als Liganden kovalent an eine Affinitätsmatrix gebunden. Hierzu wurden 0,5 g CNBr-aktivierte Sepharose (Sigma Aldrich) mit 40 mL kalter 1 mM HCl 30 min lang auf Eis gequollen. Der Überstand wurde abgenommen und die Sepharose insgesamt dreimal mit 1 mM HCl gewaschen. Dazu wurde die Sepharose durch leichtes Schwenken suspendiert und die HCl nach Absetzen der Sepharose abgezogen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in 5 mL H₂O aufgenommen und in eine Chromatographiesäule überführt. Nach Äquilibration mit entsprechendem Kopplungspuffer wurde die dialysierte Proteinfraction hinzugegeben. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgte durch kontinuierliche Rotation über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Säule auslaufen gelassen und die Säulenmatrix zweimal mit 5 mL des jeweiligen Kopplungspuffers gewaschen. Zum Blockieren von nicht reagierten aktiven Gruppen wurde das Säulenmaterial mit 5 mL kaltem 0,2 M Glycin (pH 8,0) für 2 h bei 4 °C auf dem Rad inkubiert und anschließend einmal mit 5 mL Kopplungspuffer und fünfmal mit Acetatpuffer (0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl; pH 4,0) gewaschen. Ein letzter Waschschrift erfolgte mit PBS/0,1 % Natriumazid.

4.3.5 Affinitätsreinigung von anti-EGFP Antikörpern

Die Immunisierung von Kaninchen für die Erzeugung polyklonaler, gegen EGFP gerichteter Antikörper erfolgte bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit. Als Antigen für die Immunisierung von Kaninchen wurde das Fusionsprotein 6xHis-EGFP verwendet. Das betreffende Antiserum enthält somit neben der gegen EGFP gerichteten Antikörperfraction potentiell auch Antikörper gegen die Hexahistidinmarkierung, welche zu störenden Nebenreaktionen führen können. Über zweistufige Affinitätschromatografie sollte die EGFP-Antikörperfraction von der Antikörperfraction gegen 6xHis abgetrennt und aus dem finalen

Immunserum gereinigt werden. In einem ersten Reinigungsschritt wurde das Immunserum über eine mit 6xHis-dSCC1 gekoppelte Säule gereinigt, um die unerwünschten, gegen die Hexahistidinmarkierung gerichteten, Antikörper quantitativ abzutrennen. Im Anschluss erfolgte die Reinigung über eine mit 6xHis-EGFP gekoppelte Säule um gezielt die anti-EGFP-Antikörperfraktion zu reinigen.

5 mL des finalen Immunserums IS 28 (Dürr, 2004) wurden in die 6xHis-dSCC1 gekoppelte Chromatographiesäule überführt und über Nacht mit der Matrix bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Der Durchlauf wurde gesammelt und unmittelbar auf die mit 6xHis-EGFP gekoppelte Säule gegeben. Zur Bindung der EGFP-spezifischen Antikörper an das gekoppelte Antigen wurde die Säule verschlossen und erneut über Nacht auf dem Rad inkubiert. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Säule mit 2 mL PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,4) , 6 mL BBS-Tween (0,1 M Borsäure; 25 mM Na-Tetraborat; 1 M NaCl; 0,1 % (w/v) Tween 20; pH 8,3) und erneut mit 2 mL PBS gewaschen. Für die Elution wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen je 250 µL 1 M K₂HPO₄ vorgelegt. Die Elution der Antikörper erfolgte zunächst mit 1 mL 2 M Glycin / 10 % 1,4-Dioxan, pH 2,2 und anschließend mit PBS. Es wurden insgesamt 15 Elutionsfraktionen gesammelt. Alle Elutionsfraktionen wurden umgehend gründlich vermischt, mit 100 µL NGS versetzt und bei 4 °C gelagert. Die einzelnen Eluate wurden durch initiale Immunoblot-Analyse auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern getestet, die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an Antikörpern vereinigt, gegen PBS dialysiert und mit 0,1 % (w/v) Natriumazid versetzt. Durch genauere Charakterisierung wurde für den affinitätsgereinigten anti-EGFP-Antikörper eine optimale Verdünnung 1:3000 sowohl für Western Blot als auch für Immunfluoreszenzanalysen ermittelt.

4.3.6 Western Blot und immunologischer Nachweis

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine durch Elektroblothing auf eine Hybond-ECL-Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) transferiert. Der Transfer erfolgte eine Stunde in Transferpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol) bei 100 V unter kontinuierlicher Kühlung. Nach Färbung der Proteine mit Ponceau S wurde die Membran bei RT für 1 h in Milchpuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver (Sucofin); 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS) geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Dieser wurde jeweils in geeigneter Verdünnung in Milchpuffer mit 0,02 % (w/v) Natriumazid zugegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit Milchpuffer gespült und dreimal 15 min unter Schütteln mit Milchpuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem in Milchpuffer verdünnten sekundären Antikörper. Zur Entfernung des Antikörpers wurde die Membran erneut dreimal mit Milchpuffer gespült, dreimal 15 min unter Schütteln gewaschen und schließlich 15 min mit PBT (0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS) gewaschen. Sämtliche verwendete Antikörper sowie die entsprechenden Verdünnungsfaktoren können Tabelle 4 entnommen werden. Der Nachweis der Proteine erfolgte über das 2-Komponenten-Detektionssystem der Firma pjK oder das ECL-Detektionssystem (*ECL Western Blotting Detection Reagents*) von GE Healthcare. Hierzu wurden die entsprechenden

Komponenten nach Angaben des Herstellers gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einminütiger Inkubation erfolgte die Detektion des Signals mit dem *Luminiscent Image Analyzer Las-4000* (Fujifilm) mit der dazugehörigen Software *Image Reader LAS-4000 v2.0*.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Polymerasekettenreaktionen wurden sowohl zu präparativen Zwecken (Amplifizierung von DNA-Sequenzen für die Klonierung) als auch zu analytischen Zwecken (genomische Charakterisierung) durchgeführt. Für analytische PCRs wurde die Taq-DNA-Polymerase (NEB), für präparative PCRs, aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität, die Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) eingesetzt. Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Bereichs erfolgte ausgehend von Plasmid-DNA oder genomischer DNA aus *D. melanogaster* und geeigneten, flankierenden DNA-Oligonukleotiden als Primer. Die Reaktionsansätze mit geeignetem Reaktionspuffer, dNTP-Mix und DNA-Oligonukleotiden wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µL entsprechend den Herstellerangaben und Parametern der jeweiligen Polymerase angepasst. Als *template* DNA wurden jeweils 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. 10-20 ng genomischer DNA eingesetzt. Die PCR-Reaktionen erfolgten im *TPersonal Thermocycler* (Biometra) oder dem *Perkin Elmer Cetus Gene Amp PCR System 9600*. Geeignete Temperaturprofile umfassten einen initialen Denaturierungsschritt (5 min, 95 °C) und anschließende 20-30 Zyklen aus Denaturierung (30 sec, 95 °C), Hybridisierung (30 sec, 45-60 °C) und Extension (Phusion Polymerase: 68 °C, 15 sec pro kb; Taq-Polymerase: 72 °C, 30 sec pro kb) sowie einen finalen Extensionsschritt (5 min, 68 bzw. 72 °C). Für Klonierungszwecke wurden die PCR-Produkte im Anschluss mit Hilfe des *GeneJET PCR Purification Kits* (Thermo Scientific) gereinigt und entsalzt.

4.4.1.2 PCR-Mutagenese

Zur zielgerichteten Mutagenese von DNA-Bereichen wurde die Methode der *Overlap-Extension-PCR* (OE-PCR) verwendet (Ho et al., 1989). Mit dieser Methode können zielgerichtet ein oder mehrere Basenaustausche in jede beliebige DNA-Sequenz eingebracht werden. Bei der OE-PCR müssen insgesamt drei Polymerasekettenreaktionen stattfinden (Abb. 32). Zunächst werden in zwei unabhängigen PCRs mit jeweils einem mutagenen Primer (hybridisiert an der zu mutierenden Position und enthält die substituierten Nukleotide) und einem flankierenden Primer, zwei DNA-Fragmente amplifiziert, deren Sequenzen teilweise überlappen. Der Überlappungsbereich wird dadurch sichergestellt, dass die beiden mutagenen Primer komplementär zueinander sind. In einer sich anschließenden dritten PCR werden die beiden neu synthetisierten DNA-Fragmente als *template* DNA und die beiden flankierenden DNA-Oligonukleotide als Primer eingesetzt. Durch die Basenkomplementarität kommt es zur Hybridisierung der überlappenden Sequenzbereiche beider DNA-Fragmente. Mit Hilfe der DNA-Polymerase werden zunächst die beiden Einzelstränge aufgefüllt und die Stränge schließlich vervielfältigt.

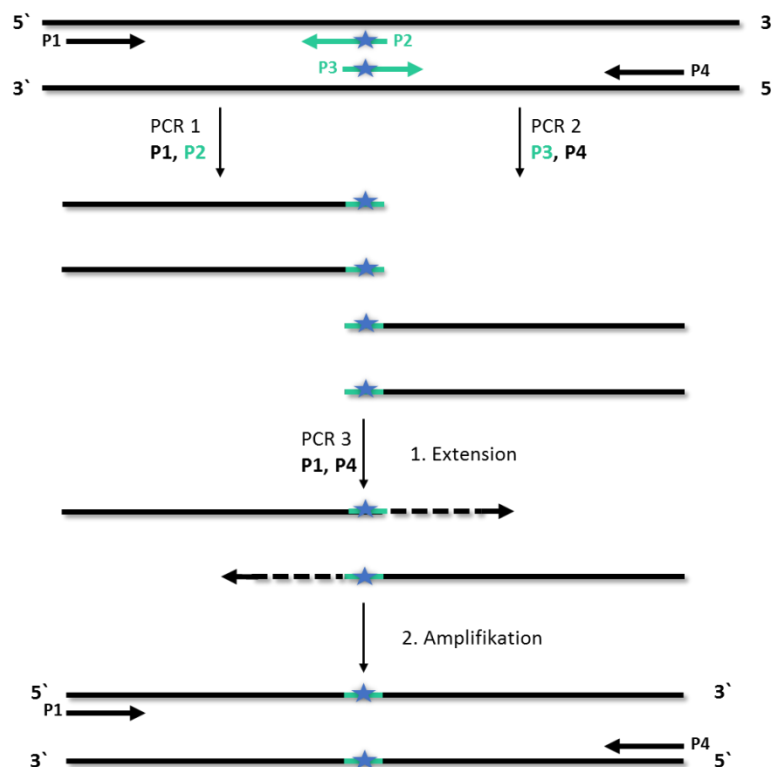


Abbildung 32 | Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese mittels OE-PCR. In zwei unabhängigen PCRs (PCR 1 und PCR 2) werden zwei DNA-Segmente (benachbarte Regionen eines Gens, welches mutiert werden soll) amplifiziert, deren Sequenzen teilweise überlappen. Der Überlappungsbereich wird durch die beiden chimären Primer (P2 und P3) erzeugt. Während diese an ihrem 3'-Ende komplementär zu dem jeweiligen amplifizierten Gensegment sind, ist das 5'-Ende komplementär zur Sequenz des zweiten Fragments und enthält die designierten Mutationen (Stern). Die beiden Produkte werden dann mit den flankierenden Primern in einer dritten PCR (PCR 3) als *template* DNA eingesetzt. Die beiden komplementären Stränge können zu einem Heteroduplex fusionieren und durch die Polymerase erst elongiert und schließlich amplifiziert werden.

4.4.1.3 Restriktionshydrolyse

Die enzymatische Restriktion erfolgte mit Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers. Für die Hydrolyse von 0,2 bis 2 µg DNA wurden 2-10 U des entsprechenden Enzyms in einem Gesamtvolumen von 20-50 µL eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden typischerweise 1-2 h bei optimaler Temperatur inkubiert. Eine Doppelrestriktion von DNA mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurde, wenn möglich, in einem einzelnen Reaktionsansatz mit einem für beide Enzyme geeigneten Puffer durchgeführt. War dies, bedingt durch die unterschiedlichen enzyspezifischen Puffer- oder Temperaturbedingungen, nicht möglich, wurde eine partielle Restriktion in zwei aufeinanderfolgenden Hydrolysereaktionen durchgeführt. Zwischen beiden Reaktionen erfolgte dabei eine Spin-Dialyse (Herzig, 1999) zum Entsalzen. Sämtliche Restriktionsansätze wurden zur Inaktivierung der Endonukleasen 15 min bei 65 °C oder 80 °C inkubiert.

4.4.1.4 Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten

Um eine Religation von hydrolysierten Plasmid-DNA im Rahmen der enzymatischen Ligation zu vermeiden, wurden die entsprechenden linearisierten Vektoren im Anschluss an die Restriktionshydrolyse an den 5'-Enden dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte mit Antarktischer Phosphatase (NEB) (etwa 5 U/ μ g) durch 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Die anschließende Hitzeinaktivierung der Phosphatase erfolgte 15 min bei 65 °C.

4.4.1.5 Enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten

Die Integration von gewünschten DNA-Fragmenten in verschiedene Plasmid-Vektoren erfolgte durch enzymatische Ligation mit T4-DNA-Ligase (Eigenpräparation des Lehrstuhls). Für eine effiziente Ligation wurde die Fragment-DNA in molarem Überschuss (Verhältnis 6:1 bis 15:1) zur Vektor-DNA eingesetzt. Entsprechende DNA-Mengen wurden mit Ligasepuffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM ATP; 10 mM DTT) und 1 μ L T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 μ L versetzt. Die Ligation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 18 °C. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Reaktionsansatz 15 min bei 65 °C inkubiert.

4.4.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Chemische Transformation

Für die chemische Transformation wurden gefrorene chemisch kompetente Zellen des entsprechenden Stammes (DH10B oder DH5 α für Klonierungsexperimente und XL1-Blue für Expressionsexperimente) auf Eis aufgetaut. Zu 100 μ L Zellsuspension wurden 10 μ L des hitzeinaktivierten Ligationsansatzes oder 0,1-0,5 μ L gereinigte Plasmid-DNA gegeben und diese Mischungen dann erneut 20 min lang im Eisbad inkubiert. Nach einem Hitzeschock über 90 Sekunden bei einer Temperatur von 42 °C folgte eine weitere zweiminütige Inkubation auf Eis. Unmittelbar danach wurde dem Transformationsmix 1 mL LB-Medium ohne Antibiotikum (1 % (w/v) Bacto Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl) zugesetzt und dieser anschließend mindestens 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um zu gewährleisten, dass das jeweilige Resistenzgen exprimiert wird. Unter sterilen Bedingungen wurden geeignete Mengen der Bakteriensuspension schließlich auf antibiotikahaltigem Selektivmedium (Ampicillin 100 μ g/ml bzw. Kanamycin 50 μ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Da eine Ampicillin-Selektion eine Vorinkubation zur Expression des Antibiotika-Resistenzgens nicht unbedingt erfordert, wurden die Zellen direkt nach Zugabe von LB-Medium ausplattiert.

Elektroporation

Um die Effizienz der Aufnahme von sehr großen Plasmiden (> 10 kb) in Bakterienzellen zu maximieren, wurde in solchen Fällen eine Elektroporation durchgeführt. 50 μ L elektrokompenter Zellen (*E. coli* DH10B) wurden auf Eis aufgetaut und 1 μ L des hitzeinaktivierten Ligationsansatzes hinzupipettiert. Der Transformationsmix wurde in eine sterile, gekühlte Transformationsküvette überführt und im *PulseController* der Firma BioRad mit einem Elektroimpuls (2,5 kV, 200 Ω , 30 μ F) stimuliert. Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium ohne Antibiotikum wurde die Bakteriensuspension in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt, 45 min bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert (siehe chemische Transformation).

4.4.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Abhängig von der benötigten Menge an Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Kits für die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen verwendet. Zu diesem Zweck wurden entweder 3 mL oder 50 mL antibiotikahaltigen Selektivmediums mit einer transformierten Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen geerntet und die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse und DNA-Reinigung über Silica-Chromatographiesäulen mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Scientific) oder dem QIAGEN® *Plasmid (Plus)-Midi Kit* entsprechend den Herstellerangaben aufbereitet.

4.4.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösung

DNA-Konzentrationen in Lösung wurden mit Hilfe des *NanoDrop-1000 Spectrophotometers* (Pqlab, Software: NanoDrop 1000 3.7.1) ermittelt. Die Konzentration errechnet sich dabei über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}). Ein OD_{260} -Wert von 1 entspricht dabei etwa einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA.

4.4.1.9 Agarosegelelektrophorese

Die präparative Aufarbeitung von DNA-Fragmenten für Klonierzwecke als auch die analytische Charakterisierung von PCR- oder Klonierungsprodukten erfolgten über Agarosegelelektrophorese. Die Herstellung der Agarosegele sowie die Durchführung der Elektrophorese wurden gemäß den Angaben bei Sambrook et al., 1989 durchgeführt. Es wurden 1 %-ige Gele auf Tris-Borat-Basis verwendet. Zur Detektion der DNA wurde sämtlichen Gelen der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/mL) zugegeben. DNA-Proben wurden mit Gelladepuffer (50 % (v/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 0,02 % (w/v) Xylencyanol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 0,02 % (w/v) SDS) versetzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 bis 180 V in TBE-Puffer (93 mM Tris-HCl (pH 8,3); 89 mM Borsäure; 25 mM EDTA). Zur Größenabschätzung der einzelnen Fragmente wurden die DNA-Längenstandards *1 kb DNA Ladder* (NEB), *100 bp DNA Ladder* (NEB) sowie ein selbst durch EcoRI-Restriktion der SPP1-Bakteriophagen DNA hergestellter Standard eingesetzt (Karin Angermann, persönliche Mitteilung). Nachweis sowie Fotografie der Fragmente erfolgte mit einem UV-Transilluminator (*GeneFlash*, Syngene) bei einer Wellenlänge von 320 nm.

4.4.1.10 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Gelextraktion ist eine Methode um DNA aus Reaktionsgemischen zu isolieren bzw. einzelne DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe voneinander abzutrennen (zum Beispiel DNA-Fragment von Vektor). Die Gelextraktion beruht auf der Agarosegelelektrophorese mit anschließender Extraktion der DNA aus dem Gel. Dazu wurde die dem designierten DNA-Fragment entsprechende Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten

und mit Hilfe des *GeneJET Gel Extraction Kits* (Thermo Scientific) gemäß des Herstellerprotokolls extrahiert.

4.4.1.11 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma Sequence Laboratories Göttingen durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden gemäß den Angaben der Firma vorbereitet. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit den Programmen *SeqBuilder* (Version 11.0.0, DNASTAR Lasergene), *Chromas* (Conor McCarthy, Griffith University, Australia; Version 1.45) und *Multalign* <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>.

4.4.1.12 Herstellung von mRNA

Die Erzeugung und Prozessierung von Flp mRNA erfolgte mit Hilfe des *mMessage mMachine R T7 Ultra Kits* (Thermo Fisher, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Als DNA-Matrize für die Transkription der Flp mRNA wurde ein für Flp kodierendes Genfragment verwendet, welches zunächst über PCR ausgehend von dem Plasmid pAS 1834 mit den Oligonukleotiden SH381 und SH382 amplifiziert wurde. Für die *in vitro* Transkription wurden 10 µL T7 2x NTP/ARCA, 2 µL 10x T7 *Reaction Buffer*, 0,1 – 1 µg Matrizen-DNA, 2 µL T7 Enzym Mix und 3 µL Nuklease-freies H₂O gemischt und der Reaktionsansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hydrolyse der DNA durch Zugabe von 1 µL TURBO DNase und 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Für die anschließende Polyadenylierung wurden dem Reaktionsansatz 80 µL *tailing reagents* (36 µL Nuklease-freies H₂O, 20 µL 5x E-Pap *Buffer*, 10 µL 25 mM MnCl₂, 10 µL ATP Solution, 4 µL E-PAP Enzyme) zugegeben und erneut 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der mRNA erfolgte durch anschließende LiCl-Präzipitation. Dazu wurden dem Reaktionsansatz 50 µL LiCl-Lösung (7,5 mM LiCl; 50 mM EDTA) zugesetzt, die RNA durch 30-minütige Inkubation bei -20 °C gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 13000 rpm, Centrifuge 5415 R, Eppendorf) präzipitiert. Das Pellet wurde mit 80 % (v/v) Ethanol gewaschen und in frischem, sterilfiltriertem Injektionspuffer (0,1 mM NaP; 5 mM KCl; pH 6,8 in Nuklease-freiem H₂O) aufgenommen. Die Herstellung von Flp mRNA erfolgte im Rahmen einer betreuten Bachelorarbeit (Kuhn, 2016).

4.4.1.13 Spezielle Klonierungsstrategien

Klonierung von pUASP-Barren-EGFP und pUASP-Barren-EGFP-T43A

Die für Barren kodierende Sequenz wurde ausgehend von dem cDNA-Klon RE48802 mit den Primern KS43 und KS44 amplifiziert und nach Hydrolyse mit NotI und Ascl in den Vektor pUASP-FA integriert. Im nächsten Schritt wurde der für EGFP kodierende Sequenzbereich mit EU87 und KS45 amplifiziert und als Ascl/XbaI-Fragment an das C-terminale Ende von Barren kloniert (pUASP-Barren-EGFP). Die Mutagenese der potentiellen Aurora B-Phosphorylierungsstelle (T43) erfolgte durch OE-PCR mit den Primern KS43, KS44, KS46 und KS47. Das im Rahmen der OE-PCR erhaltene modifizierte Barren-Fragment wurde schließlich verwendet, um den korrespondierenden, unmodifizierten Genabschnitt in pUASP-Barren-EGFP gegen dieses auszutauschen (pUASP-Barren-EGFP-T43A).

Klonierung siRNA-resistenter Varianten von SMC2, CapG und Barren

Um siRNA-resistente Varianten der für SMC2, CapG und Barren kodierenden Gene zu erzeugen, wurden die zu den siRNAs komplementären Gensequenzen durch gerichtete Mutagenese modifiziert (siehe Anhang, Abb. 37). Die Mutagenese der siRNA Erkennungsbereiche von SMC2 (CAAAACAAGTTCCTCATCAA) und CapG (GGCAGTGTCTTAGCGAATATC) erfolgte durch OE-PCR. Die entsprechenden Primerpaare für die konsekutiven PCR Amplifikationsschritte sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9 | Primerkombinationen für die OE-PCR

	Mutagenese der siRNA-Erkennungssequenz von SMC2	Mutagenese der siRNA-Erkennungssequenz von CapG
PCR 1	KS39, KS42	IH01, IH02
PCR 2	KS40, KS41	IH03, IH04
PCR 3	KS39, KS40	IH01, IH04

Die im Rahmen der OE-PCR amplifizierten Fragmente wurden verwendet, um die korrespondierenden, unmodifizierten Gensequenzen in den Konstrukten pattB-SMC2_h-EGFP bzw. pattB-CapG^{FL}-EGFP auszutauschen.

Die Mutagenese der siRNA Erkennungssequenz von Barren erfolgte durch Gensynthese des zu modifizierenden Genabschnitts. Die Klonierung des Konstrukts pattB-Barren-EGFP-siRNA^{res} geschah im Rahmen einer betreuten Bachelorarbeit (Hagn, 2017). Die Erzeugung transgener *Drosophila*-Stämme erfolgte jeweils durch Mikroinjektion der finalen Konstrukte (pattB-CapG^{FL}-EGFP-siRNA^{res}; pattB-SMC2_h-EGFP-siRNA^{res} und pattB-Barren-EGFP-siRNA^{res}) in den Stamm ϕ X-68E.

Klonierung TEV-schneidbarer Varianten von Barren

Um genomische TEV-Protease-schneidbare Varianten von Barren zu erzeugen, sollten drei konsekutive TEV-Schnittstellen an ausgewählten Positionen in die kodierende Sequenz für Barren eingefügt werden. Zu diesem Zweck wurden für die TEV-Schnittstellen kodierende Sequenzen an die jeweils designierte Position des Konstrukts pattB-Barren integriert. Da eine direkte Sequenzmodifikation in pattB-Barren durch die enorme Größe des Konstrukts erschwert wird, wurden zunächst definierte Sequenzabschnitte in die Vektoren pRSF-FA bzw. pLitmus28 subkloniert, modifiziert und schließlich in pattB-Barren zurückgesetzt. Für die Klonierung von pattB-Barren-TEV¹⁵⁶ wurde zunächst ein N-terminales *Barren*-Fragment durch Hydrolyse mit FseI aus pattB-Barren ausgeschnitten und in das Plasmid pRSF-FA integriert. Anschließend wurde über inverse PCR mit den komplementären Oligonukleotiden KS29 und KS30 eine artifizielle BsrGI-Schnittstelle eingeführt. Die für die TEV-Schnittstellen kodierende Sequenz wurde mit KS31 und KS32 aus genomischer DNA der Linie *Sco*/CyO; *Rad21*^{ex8}, *tubpr<Rad21* (3TEV-271) *myc10* amplifiziert und in die BsrGI Schnittstelle eingefügt. Schließlich wurde das modifizierte FseI-Fragment in pattB-Barren rückkloniert. Für die Klonierung von pattB-Barren-TEV⁵⁹¹ wurde ein C-terminales Fragment von Barren durch Hydrolyse mit EcoRI aus pattB-Barren isoliert und in das Plasmid pLitmus28 kloniert. Über inverse PCR mit den Oligonukleotiden KS27 und KS28 wurde eine artifizielle PpuMI-

Schnittstelle erzeugt. Die Amplifikation der TEV-Schnittstellen erfolgte durch PCR mit KS33 und KS34. Nach Integration des Amplifikats in die PpuMI-Schnittstelle erfolgte die Rückklonierung des EcoRI-Fragments in pattB-Barren.

4.5 Spezielle Methoden zur Genommanipulation mittels CRISPR/Cas

4.5.1 CRISPR/Cas-Technologie

Das CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated*)-System ist ein neuartiges, gentechnisches Verfahren zur gezielten Veränderung des Genoms in beliebigen Zielorganismen (Jinek et al., 2012). Das mehrheitlich genutzte Typ II CRISPR/Cas-System gründet sich auf der Entdeckung eines adaptiven, RNA-vermittelten Immunabwehrmechanismus des Prokaryonten *Streptococcus pyogenes* (Jinek et al., 2012; Wiedenheft et al., 2012). Es beruht auf der Erzeugung von artifiziellen Doppelstrangbrüchen in der Ziel-DNA, welche durch die endogenen Reparaturmechanismen des NHEJ (*non-homologous end joining*) oder HDR (*homology directed repair*) wieder repariert werden (Abb. 33).

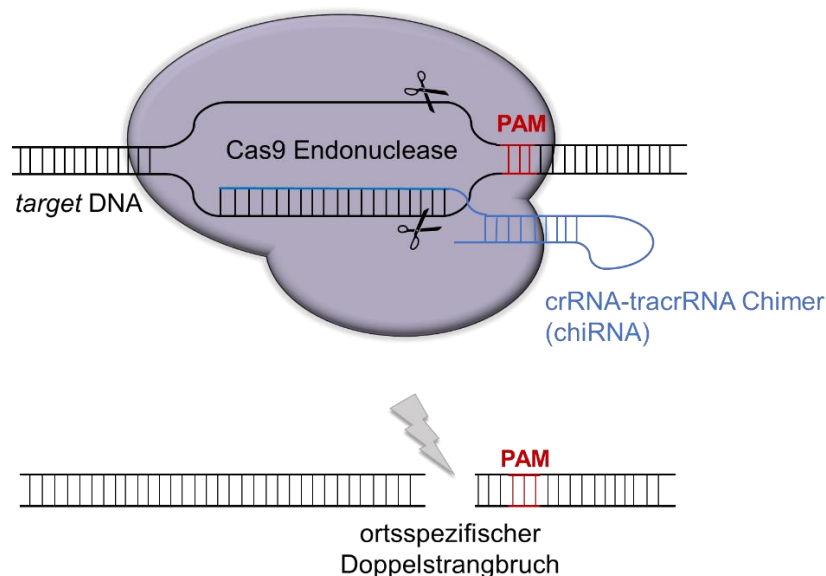


Abbildung 33 | Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems Typ II zur gezielten Genommanipulation. Die Cas9-Endonuclease wird durch die mit ihr assoziierte chiRNA an den designierten Genlocus rekrutiert. Die chiRNA ist ein synthetisches Konstrukt, welches durch die Fusion des 3`-Endes des crRNA an das 5`-Ende der tracrRNA generiert wurde. Geeignete Zielsequenzen setzen sich neben einem 20 nt umfassenden, zur crRNA komplementären, Sequenzbereich (Protospacer-Region) mit anschließender PAM-site zusammen. Nach Rekrutierung des Cas9-tracrRNA-crRNA Komplexes wird durch die Endonuclease Cas9 ein DNA-Doppelstrangbruch 3 bp *upstream* der PAM-site erzeugt.

Während die fehleranfällige NHEJ genutzt werden kann, stochastische Indel- und Punktmutationen zu erzeugen, können durch HDR heterologe DNA-Sequenzen in den

Ziellocus integriert werden (Sander and Joung, 2014). Die Spaltung beider DNA-Stränge wird durch die Endonuclease Cas9 induziert (Deltcheva et al., 2011). Um eine sequenz- bzw. ortsspezifische Spaltung zu garantieren, muss die Endonuclease Cas9 mit einem hybriden Heteroduplex zweier nicht-kodierender RNAs komplexiert sein: Der crRNA (CRISPR RNA) und der tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA) (Jinek et al., 2012). Während sich die crRNA durch Basenkomplementarität mit der Zielsequenz auszeichnet, ist die invariante tracrRNA für die Prozessierung der crRNA durch RNase III und die Aktivierung von Cas9 erforderlich (Deltcheva et al., 2011; Gottesman, 2011; Jinek et al., 2012). Um das CRISPR/Cas9-System zu vereinfachen, können tracrRNA und crRNA in einem synthetischen Fusionskonstrukt, der chiRNA (*chimeric* RNA), kombiniert werden (Jinek et al., 2012). Für die chiRNA wird häufige die synonyme Bezeichnung *guide* RNA (gRNA) verwendet. Als Ziel-DNA-Sequenzen für die Spaltung durch Cas9 fungieren 20 nt lange Bereiche, welche als Protospacer-Region bezeichnet werden. Damit die Endonuclease die Zielsequenz schneiden kann, muss diese in unmittelbarer Nähe zu einem konservierten Sequenzmotiv, dem *Protospacer adjacent motif* (PAM) liegen. Spezifische PAM-sites, die von der Cas9-Endonuclease erkannt werden sind 3 nt lange Sequenzen der Basenabfolge NGG (Jinek et al., 2012). Mit dem Typ II CRISPR/Cas9-System können potentiell sämtliche Sequenzen der Form N₂₀-NGG modifiziert werden

4.5.2 chiRNA-Design

Um Proteine am C-Terminus mit heterologen Sequenzen zu fusionieren, ist es wünschenswert den Cas9-vermittelten Doppelstrangbruch möglichst in unmittelbarer Nähe zum Stopcodon des designierten Gens zu induzieren. Für das Design geeigneter gRNAs wurde die online verfügbare Software flyCRISPR (flycrispr.molbio.wisc.edu; O'Connor-Giles, Wildonger und Harrison) verwendet. Durch Einspeisen der designierten Gensequenz wird diese auf geeignete Zielsequenzen mit angrenzender PAM-site hin untersucht. Die Suchparameter wurden dabei so gewählt, dass ausschließlich Zielsequenzen mit einer definierten Länge von 20 nt sowie einem Guanin an 5'-Position, welches für eine effiziente Transkription ausgehend von dem verwendeten Promotors (snRNA:U6:96Ab) ausschlaggebend ist (Wakiyama et al., 2005), zugelassen wurden. Gleichzeitig können mit der flyCRISPR Software potentielle *off-targets* der gRNAs innerhalb des *D. melanogaster*-Genoms vorhergesagt werden. Die Beurteilung der *off-targets* erfolgte mit maximaler Stringenz und unter Einbeziehung von Sequenzen, die anstelle des PAM-Motivs NGG das Motiv NAG beinhalten. Dies beruht auf Daten, die zeigen, dass die Cas9 Endonuklease auch derartige Zielsequenzen mit einer Effizienz von etwa 20 % schneiden kann (Hsu et al., 2013).

4.5.3 Klonierung der chiRNA pU6-chiRNA-B-E3

Die Klonierung der chiRNA erfolgte gemäß dem Protokoll, wie bei flyCRISPR angegeben (<http://flycrispr.molbio.wisc.edu/protocols/gRNA>). Die ausgewählte gRNA-Sequenz wurde zunächst in Form komplementärer Oligonukleotide von der Firma Sigma Aldrich bezogen und hybridisiert. Dazu wurden jeweils 2 µL der einzelsträngigen Oligonukleotide (100 µM) eingesetzt und in 36 µL H₂O verdünnt. Die Hybridisierung erfolgte durch fünfminütige Denaturierung bei 95 °C und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden so gewählt, dass an beiden Enden Überhänge

entstehen, die die darauffolgende Integration in den mit BbsI hydrolysierten Vektor pU6-BbsI-chiRNA (Gratz et al., 2013).

4.5.4 Klonierung der Donor-DNA pSI-CapG^C-3'UTR-noPAM-FSV3FE

Für die Erzeugung des Konstrukts pSI-CapG^C-3'UTR-noPAM-FSV3FE sollte eine SV40-Terminatorsequenz in die BglII-Schnittstelle zwischen der ersten FRT-Sequenz und der Sequenz des 3xP3-Promotors von pSI-CapG^C-F3FE integriert werden. In einem ersten Schritt wurde eine zweite, in dem Konstrukt vorhandene Schnittstelle für BglII durch Modifikation der MCS (*multiple cloning site*) eliminiert. Hierzu wurde zunächst die gesamte MCS durch Hydrolyse mit Acc65I und NcoI entfernt und durch ein doppelsträngiges Oligonukleotid (KS89/KS90) ersetzt. Die Oligonukleotidsequenz wurde dabei so gewählt, dass die durch Isolation der MCS entfernten Restriktionsschnittstellen (Acc65I, BsiWI, MluI, SpeI, NcoI) mit Ausnahme von BglII wiederhergestellt werden. Die Amplifikation der SV40-Terminatorsequenz erfolgte durch PCR mit KS66 und KS67 und dem Plasmid pUAST als Matrize. Das amplifizierte SV40-Fragment wurde an beiden terminalen Enden mit BamHI bzw. BglII hydrolysiert und in die singuläre BglII Schnittstelle integriert.

4.5.5 Klonierung der Donor-DNA pSI-Barren^C-3'UTR-noPAM-FSV3FE

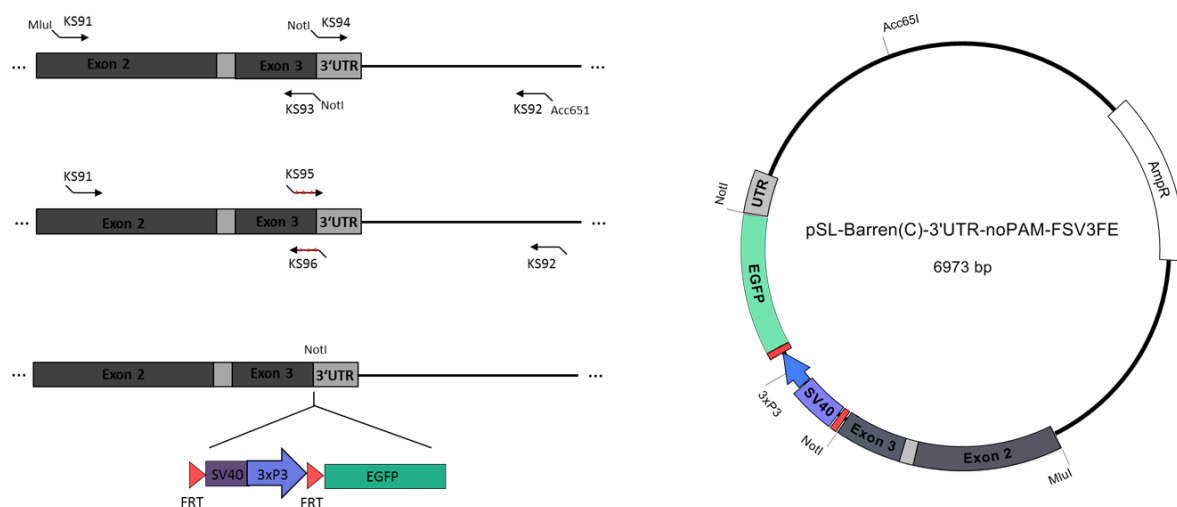


Abbildung 34 | Klonierungsschema zur Erzeugung des Donor-DNA-Plasmids pSI-Barren^C-3'UTR-noPAM-FSV3FE. Die für den C-Terminus von Barren kodierende genomische Sequenz wurde mit KS91 und KS93 amplifiziert, die 3'UTR inklusive des flankierenden genomischen Sequenzbereichs mit den Oligonukleotiden KS92 und KS94. Beide Fragmente wurden sequentiell in den Vektor pSIfa1180fa integriert. Die Mutagenese der PAM-site erfolgte über OE-PCR mit den komplementären Oligonukleotiden KS95 und KS96 sowie den flankierenden Primern KS91 und KS92. Durch die PCR werden drei Punktmutationen in der betreffenden Protospacerregion eingeführt. Das MluI/Acc65I Fragment wurde schließlich durch das modifizierte Fragment ersetzt. Die FSV3FE-Reporterkassette wurde in die NotI-Schnittstelle eingebracht.

Ein 1182 bp großes, für das C-terminale Ende von Barren kodierendes Gensegment wurde über PCR mit den Oligonukleotiden KS91 und KS93 aus genomischer DNA von nos-Cas9

Fliegen amplifiziert und über Hydrolyse mit MluI/NotI in der Vektor pSIfa1180fa integriert. Analog wurde eine 1160 bp umfassende Sequenz aus 3'-UTR sowie flankierender genomischer Region mit KS92 und KS94 amplifiziert und über NotI/Acc65I ebenfalls in diesen integriert. Durch OE-PCR mit den beiden komplementären, mutagenen Oligonukleotiden KS96 und KS95 sowie den beiden flankierenden Primern KS91 und KS92 wurde die PAM-*site* im dritten Exon von Barren mutiert und das MluI/Acc65I Fragment in pSIfa1180fa dadurch ausgetauscht. Die FSV3FE-Reporterkassette wurde durch Hydrolyse mit NotI aus dem Plasmid pSI-CapG^C-3'UTR-noPAM-FSV3FE isoliert und die NotI-Schnittstelle eingesetzt.

4.5.6 CRISPR/Cas-vermittelte Keimbahntransformation

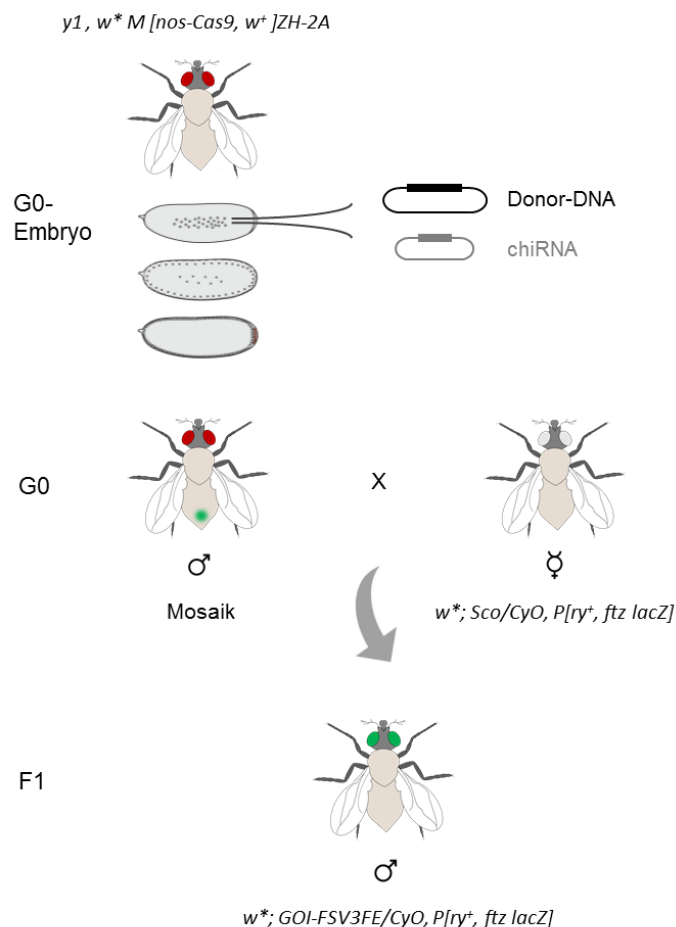


Abbildung 35 | Injektionsstrategie der CRISPR/Cas-vermittelten Keimbahntransformation und anschließende Isolation der modifizierten Allele. Donor-DNA und chiRNA-kodierendes Plasmid werden in den posterioren Pol syncytialer Embryonen des Genotyps $y^1, w^* M[nos-cas9, w^+]ZH-2A$ injiziert. Durch Expression der Endonuclease Cas9 erfolgt in den Polzellen die CRISPR-induzierte Induktion von DSBs und anschließende Reparatur auf Basis der bereitgestellten, homologen Donor-DNA. Durch die HDR-Reparatur kommt es zur Integration der EGFP-Reporterkassette (FSV3FE) in den Genlocus des designierten Gens (GOI). Die sich entwickelnden, adulten Fliegen tragen in den Keimzellen mosaikartig das veränderte Allel. Zur Isolation des modifizierten Allels *GOI-FSV3FE* werden einzelne Mosaik-Männchen (G0) mit jungfräulichen $w^*; Sco/CyO, P[ry^+, ftz lacZ]$ ausgekreuzt.

Für die CRISPR/Cas-basierte Keimbahntransformation wurde ein Injektionsmix mit je 6 µg Donor-DNA und 6 µg des für die chiRNA kodierenden Plasmids hergestellt (siehe 4.2.3.2) und in syncytiale Embryonen des Genotyps $y^1, w^* M[nos-cas9, w^+] ZH-2A$ mikroinjiziert (Abb. 35). Um die Keimbahntransmission abschätzen zu können, wurden einzelne aus der Mikroinjektion hervorgegangene Mosaik-Männchen mit jeweils drei jungfräulichen Weibchen des Genotyps $w^*; Sco/CyO, P[ry^+, ftz lacZ]$ gekreuzt (Abb. 35). Die Nachkommenschaft (F1) wurde schließlich mit dem Fluoreszenzstereomikroskop (MZ FLIII, Leica) auf grüne Augenfluoreszenz hin untersucht. Die Bildaufnahme erfolgte mit der Kamera *DFC 7000T* (Leica) und der zugehörigen Software.

4.6 Mikroskopie und Bildbearbeitung

4.6.1 Allgemeine Mikroskopiermethoden

Sämtliche immunfluoreszenzmikroskopische sowie FRAP- und *in vivo* Analysen erfolgten durch konfokale Lasermikroskopie am *Laser-Scanning*-Mikroskop Leica *Confocal TCS SP5* und der zugehörigen LCS-Software. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte gemäß der jeweiligen spezifischen Anregungswellenlänge mit den Lasern UV-Diode (Wellenlänge 405 nm für Hoechst 33258), Argonlaser (Wellenlänge 488 nm, für EGFP, Alexa 488), DPSS561 (Wellenlänge 561 nm für mRFP, Cy3, AlexaFluor 555) und Helium/Neon-Laser (Wellenlänge 633 nm für AlexaFluor 647). Für die Steigerung der Bildqualität wurden sämtliche Bilder mit 2- bis 3-facher Abrasterung aufgenommen. Alle weiteren Bildaufnahmeparameter und Einstellungen am Photomultiplier wurden den Präparaten bzw. der experimentellen Zielsetzung entsprechend angepasst. Die nachfolgende Bildbearbeitung erfolgte mit der Software *ImageJ v1.41* (*National Institutes of Health, USA*) sowie dem Programm *Adobe Photoshop* (*Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA*).

4.6.2 FRAP Mikroskopie

Für FRAP-Analysen wurden die Zysten wie unter 4.2.4.1 beschrieben vorbereitet und einzelne, in Prophase I befindliche Zysten anhand der charakteristischen Chromatinterritorien identifiziert. Nach vollständigem Alignment der Chromosomen in der Metaphaseplatte wurde die ROI (*region of interest*) definiert und die Fluoreszenz einer einzelnen Metaphaseplatte durch einen Laserimpuls (488 nm; 200 ms; ca 35 % Intensität) gebleicht. Zum direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität wurden Bilder jeweils 1,3 s vor und unmittelbar nach dem Bleichen aufgenommen. Im Anschluss erfolgten Aufnahmen in zeitlichen Abständen von 30-60 s.

4.6.3 FRAP Quantifizierung

Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software *ImageJ v1.41* (*National Institutes of Health, USA*). Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) wurde errechnet als das Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der gebleichten Metaphaseplatte (I_b) und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität einer nicht gebleichten Metaphaseplatte (I_{nb}) nach entsprechender Hintergrundkorrektur (H) gemäß der Formel $RFI = (I_b - H_b) / (I_{nb} - H_{nb})$. Die RFI-Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und die einzelnen Datenpunkte schließlich unter Anwendung einer Drei-Parameter-einfach-Exponentialfunktion mit der Software *Sigmaplot*

11.0 (Systat Software Inc., USA) in eine Kurvengleichung der Form $y=y_0+a(1-e^{-bx})$ umgewandelt. Anhand der Kurvengleichung konnte sowohl die Halbwertszeit ($t_{1/2}=\ln(0,5)/-b$) als auch die mobile Fraktion ($F_m=RFI_{t\infty}-RFI_{t0}/1-RFI_{t0}$) ermittelt werden. Dabei entspricht $RFI_{t\infty}$ der maximalen *recovery* und RFI_{t0} der RFI zum Zeitpunkt $t=0$ nach Bleichen.

5 Abkürzungsverzeichnis

<i>bam</i>	<i>bag of marbles</i>
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
Cap	<i>Chromosome associated protein</i>
Cas	CRISPR-associated
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
chiRNA	<i>chimeric RNA</i>
CNBr	Bromcyan
CRISPR	<i>Clustered regulary interspaced short palindromic repeat</i>
crRNA	CRISPR RNA
ctrl	<i>control</i>
<i>CyO</i>	<i>Curly of Oster</i> ; zweitchromosomales Balancierchromosom mit der Markermutation <i>Curly</i>
DeGradFP	<i>Degrade Green Fluorescent Protein</i>
DSB	Doppelstrangbruch
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , fötales Kälberserum
FE	FRT-EGFP
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FLP	Flippase
FRAP	<i>Fluorescence recovery after Photobleaching</i>
<i>FRT</i>	<i>flippase recognition target</i>
FSV3FE	FRT-SV40-3xP3-FRT-EGFP
F3FE	FRT-3xP3-FRT-EGFP
gRNA	<i>guide RNA</i>
HDR	<i>homology directed repair</i>
HEAT	<i>Helical repeat protein domain (Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A, TOR lipid kinase)</i>
<i>HeLa</i>	<i>Henrietta Lacks</i>
His2Av	Histon2A Variante

HR	Homologe Rekombination
IF	Immunfluoreszenz
MCS	Multiple Klonierungsstelle
mRFP	monomeres rot-fluoreszierendes Protein
NEBD	<i>nuclear envelope breakdown</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
<i>nos</i>	<i>nanos</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
POD	Peroxidase
WB	Western Blot
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
<i>Sco</i>	Dominante Markermutation <i>Scutoid</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SOLO	<i>Sisters on the loose</i>
SCF	Skp1, Cullin, F-Box
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
SV40	Poly-A Terminatorsequenz aus Simian Virus 40
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
<i>TM3, Sb/Ser</i>	Drittchromosomales Balancierchromosom <i>Third multiple #3</i> mit der Markermutation <i>Stubble/Serrate</i>
tracrRNA	<i>trans-activating CRISPR RNA</i>
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila Resource Center</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

6 Literaturverzeichnis

Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes & development* 25, 863-874.

Akai, Y., Kurokawa, Y., Nakazawa, N., Tonami-Murakami, Y., Suzuki, Y., Yoshimura, S.H., Iwasaki, H., Shiroya, Y., Nakamura, T., Shibata, E., *et al.* (2011). Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open biology* 1, 110023.

Akhmedov, A.T., Frei, C., Tsai-Pflugfelder, M., Kemper, B., Gasser, S.M., and Jessberger, R. (1998). Structural maintenance of chromosomes protein C-terminal domains bind preferentially to DNA with secondary structure. *The Journal of biological chemistry* 273, 24088-24094.

Anderson, D.E., Losada, A., Erickson, H.P., and Hirano, T. (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *The Journal of cell biology* 156, 419-424.

Andrade, M.A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics* 11, 115-116.

Aono, N., Sutani, T., Tomonaga, T., Mochida, S., and Yanagida, M. (2002). Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase. *Nature* 417, 197-202.

Arribere, J.A., Bell, R.T., Fu, B.X., Artiles, K.L., Hartman, P.S., and Fire, A.Z. (2014). Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 198, 837-846.

Bachelier-Bassi, S., Gadai, O., Bourout, G., and Nehrbass, U. (2008). Cell cycle-dependent kinetochore localization of condensin complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Struct Biol* 162, 248-259.

Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M.C., and Sherratt, D.J. (2012). In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* 338, 528-531.

Baena-Lopez, L.A., Alexandre, C., Mitchell, A., Pasakarnis, L., and Vincent, J.P. (2013). Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development* 140, 4818-4825.

Barysz, H., Kim, J.H., Chen, Z.A., Hudson, D.F., Rappsilber, J., Gerloff, D.L., and Earnshaw, W.C. (2015). Three-dimensional topology of the SMC2/SMC4 subcomplex from chicken condensin I revealed by cross-linking and molecular modelling. *Open biology* 5, 150005.

Bassett, A., and Liu, J.L. (2014a). CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in *Drosophila*. *Methods* 69, 128-136.

Bassett, A.R., and Liu, J.L. (2014b). CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 41, 7-19.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., and Liu, J.L. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports* 4, 220-228.

- Baxter, J., Sen, N., Martinez, V.L., De Carandini, M.E., Schvartzman, J.B., Diffley, J.F., and Aragon, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331, 1328-1332.
- Bazile, F., St-Pierre, J., and D'Amours, D. (2010). Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation. *Cell cycle* 9, 3243-3255.
- Beall, E.L., and Rio, D.C. (1997). *Drosophila* P-element transposase is a novel site-specific endonuclease. *Genes & development* 11, 2137-2151.
- Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., 2nd, Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y., *et al.* (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 491, 114-118.
- Belmont, A.S., Sedat, J.W., and Agard, D.A. (1987). A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *The Journal of cell biology* 105, 77-92.
- Beumer, K.J., Trautman, J.K., Bozas, A., Liu, J.L., Rutter, J., Gall, J.G., and Carroll, D. (2008). Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 19821-19826.
- Beumer, K.J., Trautman, J.K., Mukherjee, K., and Carroll, D. (2013). Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. *G3* 3, 657-664.
- Bhat, M.A., Philp, A.V., Glover, D.M., and Bellen, H.J. (1996). Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* 87, 1103-1114.
- Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3312-3317.
- Bodenstein, D. (1950). The postembryonic development of *Drosophila*. In: Demerec, M. (Ed.), *Biology of Drosophila*. Wiley and Sons, USA, 275–364.
- Bradbury, E.M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 14, 9-16.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet* 383, 1490-1502.
- Buheitel, J., and Stemmann, O. (2013). Prophase pathway-dependent removal of cohesin from human chromosomes requires opening of the Smc3-Scc1 gate. *The EMBO journal* 32, 666-676.
- Burmann, F., Shin, H.C., Basquin, J., Soh, Y.M., Gimenez-Oya, V., Kim, Y.G., Oh, B.H., and Gruber, S. (2013). An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin. *Nature structural & molecular biology* 20, 371-379.
- Buster, D.W., Daniel, S.G., Nguyen, H.Q., Windler, S.L., Skwarek, L.C., Peterson, M., Roberts, M., Meserve, J.H., Hartl, T., Klebba, J.E., *et al.* (2013). SCFSlimb ubiquitin ligase suppresses condensin II-mediated nuclear reorganization by degrading Cap-H2. *The Journal of cell biology* 201, 49-63.

- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 739-751.
- Carpenter, A.T. (1994). Chiasma function. *Cell* 77, 957-962.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D., and Dougherty, W.G. (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *The EMBO journal* 8, 365-370.
- Carrington, J.C., and Dougherty, W.G. (1988). A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3391-3395.
- Caussinus, E., Kanca, O., and Affolter, M. (2011). Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nature structural & molecular biology* 19, 117-121.
- Cenci, G., Bonaccorsi, S., Pisano, C., Verni, F., and Gatti, M. (1994). Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Journal of cell science* 107 (Pt 12), 3521-3534.
- Chan, R.C., Severson, A.F., and Meyer, B.J. (2004). Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *The Journal of cell biology* 167, 613-625.
- Charbin, A., Bouchoux, C., and Uhlmann, F. (2014). Condensin aids sister chromatid decatenation by topoisomerase II. *Nucleic acids research* 42, 340-348.
- Chen, D., and McKearin, D.M. (2003). A discrete transcriptional silencer in the *bam* gene determines asymmetric division of the *Drosophila* germline stem cell. *Development* 130, 1159-1170.
- Chuang, P.T., Albertson, D.G., and Meyer, B.J. (1994). DPY-27: a chromosome condensation protein homolog that regulates *C. elegans* dosage compensation through association with the X chromosome. *Cell* 79, 459-474.
- Cobbe, N., Savvidou, E., and Heck, M.M. (2006). Diverse mitotic and interphase functions of condensins in *Drosophila*. *Genetics* 172, 991-1008.
- Coelho, P.A., Queiroz-Machado, J., and Sunkel, C.E. (2003). Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *Journal of cell science* 116, 4763-4776.
- Collette, K.S., Petty, E.L., Golenberg, N., Bembenek, J.N., and Csankovszki, G. (2011). Different roles for Aurora B in condensin targeting during mitosis and meiosis. *Journal of cell science* 124, 3684-3694.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- Cooper, K.W. (1964). Meiotic Conjunctive Elements Not Involving Chiasmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52, 1248-1255.
- Cooper, K. W. (1965). Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: Demerec, M. (Ed.) *Biology of Drosophila*, Hafner Publishing, New York, 1-61.

- Corbett, K.D., Yip, C.K., Ee, L.S., Walz, T., Amon, A., and Harrison, S.C. (2010). The monopolin complex crosslinks kinetochore components to regulate chromosome-microtubule attachments. *Cell* **142**, 556-567.
- Cuylen, S., Metz, J., and Haering, C.H. (2011). Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nature structural & molecular biology* **18**, 894-901.
- D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008). Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes & development* **22**, 2215-2227.
- Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of molecular biology* **319**, 1097-1113.
- de la Barre, A.E., Gerson, V., Gout, S., Creaven, M., Allis, C.D., and Dimitrov, S. (2000). Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *The EMBO journal* **19**, 379-391.
- Dej, K.J., Ahn, C., and Orr-Weaver, T.L. (2004). Mutations in the *Drosophila* condensin subunit dCAP-G: defining the role of condensin for chromosome condensation in mitosis and gene expression in interphase. *Genetics* **168**, 895-906.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602-607.
- Dernburg, A.F., Sedat, J.W., and Hawley, R.S. (1996). Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* **86**, 135-146.
- DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G.M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research* **41**, 4336-4343.
- Diebold-Durand, M.L., Lee, H., Ruiz Avila, L.B., Noh, H., Shin, H.C., Im, H., Bock, F.P., Burmann, F., Durand, A., Basfeld, A., *et al.* (2017). Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Molecular cell* **67**, 334-347.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., *et al.* (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-156.
- Dougherty, W.G., and Parks, T.D. (1991). Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polypeptide: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* **183**, 449-456.
- Doughty, T.W., Arsenault, H.E., and Benanti, J.A. (2016). Levels of Ycg1 limit Condensin function during the Cell Cycle. *PLoS genetics* **12**, e1006216.
- Dürr, J. (2004). Biochemische Charakterisierung der Kinetochorkomponente CID aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Eeftens, J.M., Katan, A.J., Kschonsak, M., Hassler, M., de Wilde, L., Dief, E.M., Haering, C.H., and Dekker, C. (2016). Condensin Smc2-Smc4 Dimers Are Flexible and Dynamic. *Cell reports* **14**, 1813-1818.

- Eickbush, T.H., and Moudrianakis, E.N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* *17*, 4955-4964.
- Fabian, L., and Brill, J.A. (2012). *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages. *Spermatogenesis* *2*, 197-212.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* *26*, 125-132.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zellteilung*. Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig.
- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *The Journal of cell biology* *149*, 811-824.
- Fuentes-Perez, M.E., Gwynn, E.J., Dillingham, M.S., and Moreno-Herrero, F. (2012). Using DNA as a fiducial marker to study SMC complex interactions with the atomic force microscope. *Biophysical journal* *102*, 839-848.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Kuroiwa, T., and Hirano, T. (2013). Spatiotemporal dynamics of condensins I and II: evolutionary insights from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Molecular biology of the cell* *24*, 2515-2527.
- Fuller, M.T. (1993). Spermatogenesis. In: Bate, M., Martinez-Arias, A. (Eds.), *The development of Drosophila melanogaster*. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 71-147.
- Ganem, N.J., and Pellman, D. (2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *The Journal of cell biology* *199*, 871-881.
- Ge, D.T., Tipping, C., Brodsky, M.H., and Zamore, P.D. (2016). Rapid Screening for CRISPR-Directed Editing of the *Drosophila* Genome Using white Coconversion. *G3* *6*, 3197-3206.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J.M., and Ellenberg, J. (2006). Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Current biology : CB* *16*, 333-344.
- Giet, R., and Glover, D.M. (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *The Journal of cell biology* *152*, 669-682.
- Goldstein, L.S. (1981). Kinetochore structure and its role in chromosome orientation during the first meiotic division in male *D. melanogaster*. *Cell* *25*, 591-602.
- Golic, K.G., and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* *59*, 499-509.
- Goloborodko, A., Marko, J.F., and Mirny, L.A. (2016). Chromosome Compaction by Active Loop Extrusion. *Biophysical journal* *110*, 2162-2168.
- Gorski, M.M., Eeken, J.C., de Jong, A.W., Klink, I., Loos, M., Romeijn, R.J., van Veen, B.L., Mullenders, L.H., Ferro, W., and Pastink, A. (2003). The *Drosophila melanogaster* DNA Ligase IV gene plays a

crucial role in the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks and acts synergistically with Rad54. *Genetics* 165, 1929-1941.

Gottesman, S. (2011). Microbiology: Dicing defence in bacteria. *Nature* 471, 588-589.

Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., and O'Connor-Giles, K.M. (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194, 1029-1035.

Gratz, S.J., Ukken, F.P., Rubinstein, C.D., Thiede, G., Donohue, L.K., Cummings, A.M., and O'Connor-Giles, K.M. (2014). Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics* 196, 961-971.

Graumann, P.L., and Knust, T. (2009). Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 17, 265-275.

Green, L.C., Kalitsis, P., Chang, T.M., Cipetic, M., Kim, J.H., Marshall, O., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Vagnarelli, P., Samejima, K., *et al.* (2012). Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. *Journal of cell science* 125, 1591-1604.

Greenspan, R. J. (1997). *Fly Pushing. The theory and practice of Drosophila genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Groth, A.C., Fish, M., Nusse, R., and Calos, M.P. (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* 166, 1775-1782.

Haering, C.H., Farcas, A.M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454, 297-301.

Haering, C.H., and Gruber, S. (2016). SnapShot: SMC Protein Complexes Part I. *Cell* 164, 326-326 e321.

Haeusler, R.A., Pratt-Hyatt, M., Good, P.D., Gipson, T.A., and Engelke, D.R. (2008). Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes & development* 22, 2204-2214.

Häfner, R. (2012). Erzeugung von Antikörpern und transgenen Linien zur Charakterisierung der Rolle von Condensin-Untereinheiten während der männlichen Keimzellbildung in *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.

Hagn, G. (2017). Konstruktion eines RNAi-resistenten Barren-EGFP Transgens und immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung der embryonalen Bownes-Stadien von *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.

Hagstrom, K.A., Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., and Meyer, B.J. (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes & development* 16, 729-742.

Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.

Hardy, R.W., Tokuyasu, K.T., Lindsley, D.L., and Garavito, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of ultrastructure research* 69, 180-190.

- Harris, D., Orme, C., Kramer, J., Namba, L., Champion, M., Palladino, M.J., Natzle, J., and Hawley, R.S. (2003). A deficiency screen of the major autosomes identifies a gene (*matrimony*) that is haplo-insufficient for achiasmate segregation in *Drosophila* oocytes. *Genetics* 165, 637-652.
- Hartl, T.A., Smith, H.F., and Bosco, G. (2008a). Chromosome alignment and transvection are antagonized by condensin II. *Science* 322, 1384-1387.
- Hartl, T.A., Sweeney, S.J., Knepler, P.J., and Bosco, G. (2008b). Condensin II resolves chromosomal associations to enable anaphase I segregation in *Drosophila* male meiosis. *PLoS genetics* 4, e1000228.
- Hawley, R.S., Irick, H., Zitron, A.E., Haddox, D.A., Lohe, A., New, C., Whitley, M.D., Arbel, T., Jang, J., McKim, K., *et al.* (1992). There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila* females, one of which requires heterochromatic homology. *Developmental genetics* 13, 440-467.
- Hawley, R.S., and Theurkauf, W.E. (1993). Requiem for distributive segregation: achiasmate segregation in *Drosophila* females. *Trends in genetics : TIG* 9, 310-317.
- Hazelett, D.J., Bourouis, M., Walldorf, U., and Treisman, J.E. (1998). *decapentaplegic* and *wingless* are regulated by *eyes absent* and *eyegone* and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* 125, 3741-3751.
- Heale, J.T., Ball, A.R., Jr., Schmiesing, J.A., Kim, J.S., Kong, X., Zhou, S., Hudson, D.F., Earnshaw, W.C., and Yokomori, K. (2006). Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair. *Molecular cell* 21, 837-848.
- Heidmann, D., Horn, S., Heidmann, S., Schleiffer, A., Nasmyth, K., and Lehner, C.F. (2004). The *Drosophila* meiotic kleisin C(2)M functions before the meiotic divisions. *Chromosoma* 113, 177-187.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S., and van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 716-721.
- Henley, T., Mangena, R., Sivapalan, R. and Rhodes, E. (2014) Real-world gene editing issues: improving knock-in efficiency, *JOIN AAAS*. 31-32
- Herzig, A. (1999). Untersuchungen zur Wechselwirkungen der *Drosophila melanogaster* Proteine Pimples und Three rows. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Herzog, S. (2011). Analyse von Condensin-Komplexen in *Drosophila melanogaster* Charakterisierung der Untereinheit CapG und Identifizierung von Interaktionen. Dissertation am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Herzog, S., Nagarkar Jaiswal, S., Urban, E., Riemer, A., Fischer, S., and Heidmann, S.K. (2013). Functional dissection of the *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G reveals its exclusive association with condensin I. *PLoS genetics* 9, e1003463.
- Hirano, M., Anderson, D.E., Erickson, H.P., and Hirano, T. (2001). Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *The EMBO journal* 20, 3238-3250.

- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 311-322.
- Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes & development* 26, 1659-1678.
- Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* 89, 511-521.
- Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79, 449-458.
- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *Journal of cell science* 117, 6435-6445.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Holm, C. (1994). Coming undone: how to untangle a chromosome. *Cell* 77, 955-957.
- Horn, C., and Wimmer, E.A. (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Development genes and evolution* 210, 630-637.
- Houlard, M., Godwin, J., Metson, J., Lee, J., Hirano, T., and Nasmyth, K. (2015). Condensin confers the longitudinal rigidity of chromosomes. *Nature cell biology* 17, 771-781.
- Hsieh, T., and Brutlag, D. (1979). Sequence and sequence variation within the 1.688 g/cm³ satellite DNA of *Drosophila melanogaster*. *Journal of molecular biology* 135, 465-481.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., *et al.* (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology* 31, 827-832.
- Hudson, D.F., Ohta, S., Freisinger, T., Macisaac, F., Sennels, L., Alves, F., Lai, F., Kerr, A., Rappsilber, J., and Earnshaw, W.C. (2008). Molecular and genetic analysis of condensin function in vertebrate cells. *Molecular biology of the cell* 19, 3070-3079.
- Hudson, D.F., Vagnarelli, P., Gassmann, R., and Earnshaw, W.C. (2003). Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Developmental cell* 5, 323-336.
- Iwasaki, O., Tanaka, A., Tanizawa, H., Grewal, S.I., and Noma, K. (2010). Centromeric localization of dispersed Pol III genes in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 21, 254-265.
- Jackson, A.P., Eastwood, H., Bell, S.M., Adu, J., Toomes, C., Carr, I.M., Roberts, E., Hampshire, D.J., Crow, Y.J., Mighell, A.J., *et al.* (2002). Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *American journal of human genetics* 71, 136-142.
- Jager, H., Rauch, M., and Heidmann, S. (2005). The *Drosophila melanogaster* condensin subunit Cap-G interacts with the centromere-specific histone H3 variant CID. *Chromosoma* 113, 350-361.
- Jessberger, R., Frei, C., and Gasser, S.M. (1998). Chromosome dynamics: the SMC protein family. *Current opinion in genetics & development* 8, 254-259.

- Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-496.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Jordan, M. (2015). Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems zum *Genome Engineering* in *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., and Maeshima, K. (2012). Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* 3, 404-410.
- Kagami, Y., Ono, M., and Yoshida, K. (2017). Plk1 phosphorylation of CAP-H2 triggers chromosome condensation by condensin II at the early phase of mitosis. *Scientific reports* 7, 5583.
- Kahsai, L., Millburn, G.H., and Cook, K.R. (2016). Phenotypes Associated with Second Chromosome P Element Insertions in *Drosophila melanogaster*. *G3* 6, 2665-2670.
- Kaitna, S., Pasierbek, P., Jantsch, M., Loidl, J., and Glotzer, M. (2002). The aurora B kinase AIR-2 regulates kinetochores during mitosis and is required for separation of homologous Chromosomes during meiosis. *Current biology : CB* 12, 798-812.
- Kane, N.S., Vora, M., Varre, K.J., and Padgett, R.W. (2017). Efficient Screening of CRISPR/Cas9-Induced Events in *Drosophila* Using a Co-CRISPR Strategy. *G3* 7, 87-93.
- Kapust, R.B., Tozser, J., Fox, J.D., Anderson, D.E., Cherry, S., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein engineering* 14, 993-1000.
- Karpen, G.H., Le, M.H., and Le, H. (1996). Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science* 273, 118-122.
- Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375-384.
- Keenholtz, R.A., Dhanaraman, T., Palou, R., Yu, J., D'Amours, D., and Marko, J.F. (2017). Oligomerization and ATP stimulate condensin-mediated DNA compaction. *Scientific reports* 7, 14279.
- Kim, H., Ishidate, T., Ghanta, K.S., Seth, M., Conte, D., Jr., Shirayama, M., and Mello, C.C. (2014). A co-CRISPR strategy for efficient genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 197, 1069-1080.
- Kim, J., Ishiguro, K., Nambu, A., Akiyoshi, B., Yokobayashi, S., Kagami, A., Ishiguro, T., Pendas, A.M., Takeda, N., Sakakibara, Y., *et al.* (2015). Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* 517, 466-471.
- Kimura, K., Cuvier, O., and Hirano, T. (2001). Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts. *The Journal of biological chemistry* 276, 5417-5420.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 282, 487-490.
- Kimura, K., and Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90, 625-634.

- Kimura, K., Rybenkov, V.V., Crisona, N.J., Hirano, T., and Cozzarelli, N.R. (1999). 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. *Cell* 98, 239-248.
- Kinoshita, K., Kobayashi, T.J., and Hirano, T. (2015). Balancing acts of two HEAT subunits of condensin I support dynamic assembly of chromosome axes. *Developmental cell* 33, 94-106.
- Klug, W.S. (2012). Concepts of genetics, 10th edn, Pearson Education, San Francisco
- Kong, X., Stephens, J., Ball, A.R., Jr., Heale, J.T., Newkirk, D.A., Berns, M.W., and Yokomori, K. (2011). Condensin I recruitment to base damage-enriched DNA lesions is modulated by PARP1. *PloS one* 6, e23548.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kramer (1999). Untersuchungen zur Regulation der dacapo-Expression in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., and Haering, C.H. (2017). Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* 171, 588-600 e524.
- Kuhn, R. (2016). Evaluation von Injektionsstrategien zur Flp-Rekombinase vermittelten Excision von Reportergen-kassetten sowie Analyse von endogen exprimierten photokonvertierbaren Fluoreszenzproteinen in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Lake, C.M., and Hawley, R.S. (2012). The molecular control of meiotic chromosomal behavior: events in early meiotic prophase in *Drosophila* oocytes. *Annual review of physiology* 74, 425-451.
- Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes & development* 18, 76-87.
- Lee, J., Ogushi, S., Saitou, M., and Hirano, T. (2011). Condensins I and II are essential for construction of bivalent chromosomes in mouse oocytes. *Molecular biology of the cell* 22, 3465-3477.
- Leonard, J., Sen, N., Torres, R., Sutani, T., Jarmuz, A., Shirahige, K., and Aragon, L. (2015). Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase. *Cell reports* 13, 2336-2344.
- Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., Li, Y., Gao, N., Wang, L., Lu, X., *et al.* (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology* 31, 681-683.
- Li, G., and Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current opinion in genetics & development* 21, 175-186.
- Li, G., Sudlow, G., and Belmont, A.S. (1998). Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning. *The Journal of cell biology* 140, 975-989.

- Li, W., Hu, Y., Oh, S., Ma, Q., Merkurjev, D., Song, X., Zhou, X., Liu, Z., Tanasa, B., He, X., *et al.* (2015). Condensin I and II Complexes License Full Estrogen Receptor alpha-Dependent Enhancer Activation. *Molecular cell* 59, 188-202.
- Lindsley, D. and Tokuyasu, K.T. (1980). Spermatogenesis. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (Eds.), *Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2d. Academic Press, New York USA, 225–294.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I., and Peters, J.M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *Journal of cell science* 120, 1245-1255.
- Lobo, N., Li, X., and Fraser, M.J., Jr. (1999). Transposition of the piggyBac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni*. *Molecular & general genetics : MGG* 261, 803-810.
- Losada, A., Hirano, M., and Hirano, T. (1998). Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes & development* 12, 1986-1997.
- Loukeris, T.G., Arca, B., Livadaras, I., Dialektaki, G., and Savakis, C. (1995). Introduction of the transposable element Minos into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9485-9489.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lupo, R., Breiling, A., Bianchi, M.E., and Orlando, V. (2001). *Drosophila* chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Molecular cell* 7, 127-136.
- Maeshima, K., Hihara, S., and Takata, H. (2010). New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without 30-nm chromatin structure. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 75, 439-444.
- Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Developmental cell* 4, 467-480.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826.
- Marko, J.F. (2008). Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 16, 469-497.
- Marko, J.F., and Siggia, E.D. (1997). Polymer models of meiotic and mitotic chromosomes. *Molecular biology of the cell* 8, 2217-2231.
- Marsden, M.P., and Laemmli, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849-858.
- Martin, C.A., Murray, J.E., Carroll, P., Leitch, A., Mackenzie, K.J., Halachev, M., Fetit, A.E., Keith, C., Bicknell, L.S., Fluteau, A., *et al.* (2016). Mutations in genes encoding condensin complex proteins cause microcephaly through decatenation failure at mitosis. *Genes & development* 30, 2158-2172.

- McIntosh, J.R., Molodtsov, M.I., and Ataullakhanov, F.I. (2012). Biophysics of mitosis. *Quarterly reviews of biophysics* 45, 147-207.
- McKee, B.D. (2004). Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochimica et biophysica acta* 1677, 165-180.
- McKee, B.D., Habera, L., and Vrana, J.A. (1992). Evidence that intergenic spacer repeats of *Drosophila melanogaster* rRNA genes function as X-Y pairing sites in male meiosis, and a general model for achiasmatic pairing. *Genetics* 132, 529-544.
- McKee, B.D., and Karpen, G.H. (1990). *Drosophila* ribosomal RNA genes function as an X-Y pairing site during male meiosis. *Cell* 61, 61-72.
- McKee, B.D., Lumsden, S.E., and Das, S. (1993). The distribution of male meiotic pairing sites on chromosome 2 of *Drosophila melanogaster*: meiotic pairing and segregation of 2-Y transpositions. *Chromosoma* 102, 180-194.
- McKee, B.D., Yan, R., and Tsai, J.H. (2012). Meiosis in male *Drosophila*. *Spermatogenesis* 2, 167-184.
- McKim, K.S., Green-Marroquin, B.L., Sekelsky, J.J., Chin, G., Steinberg, C., Khodosh, R., and Hawley, R.S. (1998). Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279, 876-878.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *The Journal of cell biology* 142, 1595-1604.
- Mendoza, M., Norden, C., Durrer, K., Rauter, H., Uhlmann, F., and Barral, Y. (2009). A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nature cell biology* 11, 477-483.
- Mengoli, V., Bucciarelli, E., Lattao, R., Piergentili, R., Gatti, M., and Bonaccorsi, S. (2014). The analysis of mutant alleles of different strength reveals multiple functions of topoisomerase 2 in regulation of *Drosophila* chromosome structure. *PLoS genetics* 10, e1004739.
- Mets, D.G., and Meyer, B.J. (2009). Condensins regulate meiotic DNA break distribution, thus crossover frequency, by controlling chromosome structure. *Cell* 139, 73-86.
- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35-45.
- Micklem, D.R., Dasgupta, R., Elliott, H., Gergely, F., Davidson, C., Brand, A., Gonzalez-Reyes, A., and St Johnston, D. (1997). The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*. *Current biology : CB* 7, 468-478.
- Minnen, A., Burmann, F., Wilhelm, L., Anchimiuk, A., Diebold-Durand, M.L., and Gruber, S. (2016). Control of SMC Coiled Coil Architecture by the ATPase Heads Facilitates Targeting to Chromosomal ParB/parS and Release onto Flanking DNA. *Cell reports* 14, 2003-2016.
- Moore, D.P., and Orr-Weaver, T.L. (1998). Chromosome segregation during meiosis: building an unambivalent bivalent. *Current topics in developmental biology* 37, 263-299.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology* 13, 261-291.
- Morgan, D.O. (2007). *The cell cycle: principles of control*. Oxford University Press.

- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell* 163, 1628-1640.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Musacchio, A., and Desai, A. (2017). A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function. *Biology* 6. doi: 10.3390/biology6010005.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual review of genetics* 43, 525-558.
- Nasmyth, K., and Schleiffer, A. (2004). From a single double helix to paired double helices and back. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 359, 99-108.
- Naumova, N., Imakaev, M., Fudenberg, G., Zhan, Y., Lajoie, B.R., Mirny, L.A., and Dekker, J. (2013). Organization of the mitotic chromosome. *Science* 342, 948-953.
- Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome research* 10, 1445-1452.
- Ni, J.Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., *et al.* (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nature methods* 8, 405-407.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-332.
- Oliveira, R.A., Heidmann, S., and Sunkel, C.E. (2007). Condensin I binds chromatin early in prophase and displays a highly dynamic association with *Drosophila* mitotic chromosomes. *Chromosoma* 116, 259-274.
- Olivieri, G., and Olivieri, A. (1965). Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation research* 2, 366-380.
- Onn, I., Aono, N., Hirano, M., and Hirano, T. (2007). Reconstitution and subunit geometry of human condensin complexes. *The EMBO journal* 26, 1024-1034.
- Ono, T., Fang, Y., Spector, D.L., and Hirano, T. (2004). Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Molecular biology of the cell* 15, 3296-3308.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115, 109-121.
- Orr-Weaver, T.L. (1995). Meiosis in *Drosophila*: seeing is believing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10443-10449.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301, 785-789.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 525-558.

- Paques, F., and Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 63, 349-404.
- Pauli, A., Althoff, F., Oliveira, R.A., Heidmann, S., Schuldiner, O., Lehner, C.F., Dickson, B.J., and Nasmyth, K. (2008). Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Developmental cell* 14, 239-251.
- Paulson, J.R., and Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828.
- Petersen, J., and Hagan, I.M. (2003). *S. pombe* aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Current biology* : CB 13, 590-597.
- Petronczki, M., Siomos, M.F., and Nasmyth, K. (2003). Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112, 423-440.
- Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A.G., Tropea, J.E., Peters, H.K., 3rd, Kapust, R.B., Li, M., Wlodawer, A., and Waugh, D.S. (2002). Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. *The Journal of biological chemistry* 277, 50564-50572.
- Piazza, I., Haering, C.H., and Rutkowska, A. (2013). Condensin: crafting the chromosome landscape. *Chromosoma* 122, 175-190.
- Piazza, I., Rutkowska, A., Ori, A., Walczak, M., Metz, J., Pelechano, V., Beck, M., and Haering, C.H. (2014). Association of condensin with chromosomes depends on DNA binding by its HEAT-repeat subunits. *Nature structural & molecular biology* 21, 560-568.
- Piskadlo, E., Tavares, A., and Oliveira, R.A. (2017). Metaphase chromosome structure is dynamically maintained by condensin I-directed DNA (de)catenation. *eLife* 6. doi: 10.7554/eLife.26120.
- Port, F., Chen, H.M., Lee, T., and Bullock, S.L. (2014). Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E2967-2976.
- Rawlings, J.S., Gatzka, M., Thomas, P.G., and Ihle, J.N. (2011). Chromatin condensation via the condensin II complex is required for peripheral T-cell quiescence. *The EMBO journal* 30, 263-276.
- Razin, S.V., and Gavrilov, A.A. (2014). Chromatin without the 30-nm fiber: constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics* 9, 653-657.
- Ren, X., Sun, J., Housden, B.E., Hu, Y., Roesel, C., Lin, S., Liu, L.P., Yang, Z., Mao, D., Sun, L., *et al.* (2013). Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19012-19017.
- Renshaw, M.J., Ward, J.J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nedelec, F.J., and Tanaka, T.U. (2010). Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Developmental cell* 19, 232-244.
- Resnick, T.D., Dej, K.J., Xiang, Y., Hawley, R.S., Ahn, C., and Orr-Weaver, T.L. (2009). Mutations in the chromosomal passenger complex and the condensin complex differentially affect synaptonemal complex disassembly and metaphase I configuration in *Drosophila* female meiosis. *Genetics* 181, 875-887.

- Riemer, A. (2012). Dynamik von Condensin-Untereinheiten in *Drosophila melanogaster*: Die Rolle der Kernlokalisierung von Cap-G und Analyse der Chromatinassoziation von SMC2. Masterarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- Roberts, D. B. (1998) *Drosophila - A practical approach*. Oxford University Press, Oxford
- Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Current opinion in structural biology* 16, 336-343.
- Rorth, P. (1998). Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mechanisms of development* 78, 113-118.
- Rybenkov, V.V., Herrera, V., Petrushenko, Z.M., and Zhao, H. (2014). MukBEF, a chromosomal organizer. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 24, 371-383.
- Saerens, D., Pellis, M., Loris, R., Pardon, E., Dumoulin, M., Matagne, A., Wyns, L., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2005). Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *Journal of molecular biology* 352, 597-607.
- Saitoh, N., Goldberg, I.G., Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *The Journal of cell biology* 127, 303-318.
- Sakai, A., Hizume, K., Sutani, T., Takeyasu, K., and Yanagida, M. (2003). Condensin but not cohesin SMC heterodimer induces DNA reannealing through protein-protein assembly. *The EMBO journal* 22, 2764-2775.
- Salzberg, A., Prokopenko, S.N., He, Y., Tsai, P., Pal, M., Maroy, P., Glover, D.M., Deak, P., and Bellen, H.J. (1997). P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics* 147, 1723-1741.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology* 32, 347-355.
- Savvidou, E., Cobbe, N., Steffensen, S., Cotterill, S., and Heck, M.M. (2005). *Drosophila* CAP-D2 is required for condensin complex stability and resolution of sister chromatids. *Journal of cell science* 118, 2529-2543.
- Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K., and Eisenhaber, F. (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Molecular cell* 11, 571-575.
- Schmiesing, J.A., Gregson, H.C., Zhou, S., and Yokomori, K. (2000). A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of *Xenopus* XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation. *Molecular and cellular biology* 20, 6996-7006.
- Schuh, M., Lehner, C.F., and Heidmann, S. (2007). Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Current biology : CB* 17, 237-243.
- Sebo, Z.L., Lee, H.B., Peng, Y., and Guo, Y. (2014). A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for *Drosophila* genomic engineering. *Fly* 8, 52-57.

Sedat, J., and Manuelidis, L. (1978). A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 42 Pt 1, 331-350.

Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L., *et al.* (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology 31, 686-688.

Shintomi, K., and Hirano, T. (2011). The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. Genes & development 25, 1464-1469.

Shintomi, K., Takahashi, T.S., and Hirano, T. (2015). Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. Nature cell biology 17, 1014-1023.

Siddiqui, N.U., Stronghill, P.E., Dengler, R.E., Hasenkampf, C.A., and Riggs, C.D. (2003). Mutations in Arabidopsis condensin genes disrupt embryogenesis, meristem organization and segregation of homologous chromosomes during meiosis. Development 130, 3283-3295.

Simmler, J. (2016). Evaluation des *Drosophila* Brahma Chromatin-Remodellierungskomplexes als potentieller Interaktor der Condensin-Untereinheit Cap-G. Masterarbeit am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, Bayreuth.

Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. Cell 91, 209-219.

Smurnyy, Y., Toms, A.V., Hickson, G.R., Eck, M.J., and Eggert, U.S. (2010). Binucleine 2, an isoform-specific inhibitor of Drosophila Aurora B kinase, provides insights into the mechanism of cytokinesis. ACS chemical biology 5, 1015-1020.

Spradling, A.C., and Rubin, G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. Science 218, 341-347.

St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauve, V., Ratsima, H., and D'Amours, D. (2009). Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. Molecular cell 34, 416-426.

Steffensen, S., Coelho, P.A., Cobbe, N., Vass, S., Costa, M., Hassan, B., Prokopenko, S.N., Bellen, H., Heck, M.M., and Sunkel, C.E. (2001). A role for Drosophila SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis. Current biology : CB 11, 295-307.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. Cell 136, 473-484.

Strick, T.R., Kawaguchi, T., and Hirano, T. (2004). Real-time detection of single-molecule DNA compaction by condensin I. Current biology : CB 14, 874-880.

Strunnikov, A.V., and Jessberger, R. (1999). Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions. European journal of biochemistry 263, 6-13.

Sullivan, W., Ashburner, M. and Hawley, R. S. (2000). Drosophila Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sun, F.L., Cuaycong, M.H., Craig, C.A., Wallrath, L.L., Locke, J., and Elgin, S.C. (2000). The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*: interspersed euchromatic and heterochromatic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5340-5345.

Sutani, T., Sakata, T., Nakato, R., Masuda, K., Ishibashi, M., Yamashita, D., Suzuki, Y., Hirano, T., Bando, M., and Shirahige, K. (2015). Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nature communications* 6, 7815.

Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., and Yanagida, M. (1999). Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes & development* 13, 2271-2283.

Swedlow, J.R., and Hirano, T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Molecular cell* 11, 557-569.

Szekvolgyi, L., and Nicolas, A. (2010). From meiosis to postmeiotic events: homologous recombination is obligatory but flexible. *The FEBS journal* 277, 571-589.

Tada, K., Susumu, H., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2011). Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* 474, 477-483.

Takemoto, A., Kimura, K., Yanagisawa, J., Yokoyama, S., and Hanaoka, F. (2006). Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation. *The EMBO journal* 25, 5339-5348.

Takemoto, A., Kimura, K., Yokoyama, S., and Hanaoka, F. (2004). Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. *The Journal of biological chemistry* 279, 4551-4559.

Takemoto, A., Murayama, A., Katano, M., Urano, T., Furukawa, K., Yokoyama, S., Yanagisawa, J., Hanaoka, F., and Kimura, K. (2007). Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. *Nucleic acids research* 35, 2403-2412.

Tanaka, A., Tanizawa, H., Sriswasdi, S., Iwasaki, O., Chatterjee, A.G., Speicher, D.W., Levin, H.L., Noguchi, E., and Noma, K. (2012). Epigenetic regulation of condensin-mediated genome organization during the cell cycle and upon DNA damage through histone H3 lysine 56 acetylation. *Molecular cell* 48, 532-546.

Thomas, S.E., Soltani-Bejnood, M., Roth, P., Dorn, R., Logsdon, J.M., Jr., and McKee, B.D. (2005). Identification of two proteins required for conjunction and regular segregation of achiasmate homologs in *Drosophila* male meiosis. *Cell* 123, 555-568.

Thornton, G.K., and Woods, C.G. (2009). Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends in genetics* : TIG 25, 501-510.

Thorpe, H.M., Wilson, S.E., and Smith, M.C. (2000). Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Molecular microbiology* 38, 232-241.

Tomkiel, J.E., Wakimoto, B.T., and Briscoe, A., Jr. (2001). The teflon gene is required for maintenance of autosomal homolog pairing at meiosis I in male *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 157, 273-281.

Toth, A., Rabitsch, K.P., Galova, M., Schleiffer, A., Buonomo, S.B., and Nasmyth, K. (2000). Functional genomics identifies monopolin: a kinetochore protein required for segregation of homologs during meiosis I. *Cell* 103, 1155-1168.

- Tsai, C.J., Mets, D.G., Albrecht, M.R., Nix, P., Chan, A., and Meyer, B.J. (2008). Meiotic crossover number and distribution are regulated by a dosage compensation protein that resembles a condensin subunit. *Genes & development* 22, 194-211.
- Tsai, J.H., Yan, R., and McKee, B.D. (2011). Homolog pairing and sister chromatid cohesion in heterochromatin in *Drosophila* male meiosis I. *Chromosoma* 120, 335-351.
- Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859-864.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37-42.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M.A., Koonin, E.V., and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* 103, 375-386.
- Urban, E., Nagarkar-Jaiswal, S., Lehner, C.F., and Heidmann, S.K. (2014). The cohesin subunit Rad21 is required for synaptonemal complex maintenance, but not sister chromatid cohesion, during *Drosophila* female meiosis. *PLoS genetics* 10, e1004540.
- Viera, A., Gomez, R., Parra, M.T., Schmiesing, J.A., Yokomori, K., Rufas, J.S., and Suja, J.A. (2007). Condensin I reveals new insights on mouse meiotic chromosome structure and dynamics. *PloS one* 2, e783.
- Wakiyama, M., Matsumoto, T., and Yokoyama, S. (2005). *Drosophila* U6 promoter-driven short hairpin RNAs effectively induce RNA interference in Schneider 2 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 1163-1170.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal* 1, 945-951.
- Wang, B.D., Eyre, D., Basrai, M., Lichten, M., and Strunnikov, A. (2005). Condensin binding at distinct and specific chromosomal sites in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Molecular and cellular biology* 25, 7216-7225.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910-918.
- Ward, J.D. (2015). Rapid and precise engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome with lethal mutation co-conversion and inactivation of NHEJ repair. *Genetics* 199, 363-377.
- Watanabe, Y. (2004). Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *Journal of cell science* 117, 4017-4023.
- Watanabe, Y. (2006). A one-sided view of kinetochore attachment in meiosis. *Cell* 126, 1030-1032.
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 370-382.
- Wei, Y., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in

Tetrahymena. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 7480-7484.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97, 99-109.

White-Cooper, H. (2012). Tissue, cell type and stage-specific ectopic gene expression and RNAi induction in the *Drosophila* testis. *Spermatogenesis* 2, 11-22.

Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482, 331-338.

Wilhelm, L., Burmann, F., Minnen, A., Shin, H.C., Toseland, C.P., Oh, B.H., and Gruber, S. (2015). SMC condensin entraps chromosomal DNA by an ATP hydrolysis dependent loading mechanism in *Bacillus subtilis*. *eLife* 4.

Woo, J.S., Lim, J.H., Shin, H.C., Suh, M.K., Ku, B., Lee, K.H., Joo, K., Robinson, H., Lee, J., Park, S.Y., *et al.* (2009). Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions. *Cell* 136, 85-96.

Wood, J.L., Liang, Y., Li, K., and Chen, J. (2008). Microcephalin/MCPH1 associates with the Condensin II complex to function in homologous recombination repair. *The Journal of biological chemistry* 283, 29586-29592.

Wu, N., and Yu, H. (2012). The Smc complexes in DNA damage response. *Cell & bioscience* 2, 5.

Xu, Y., Leung, C.G., Lee, D.C., Kennedy, B.K., and Crispino, J.D. (2006). MTB, the murine homolog of condensin II subunit CAP-G2, represses transcription and promotes erythroid cell differentiation. *Leukemia* 20, 1261-1269.

Xue, Z., Wu, M., Wen, K., Ren, M., Long, L., Zhang, X., and Gao, G. (2014). CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3* 4, 2167-2173.

Yamamoto, M. (1979). Cytological studies of heterochromatin function in the *Drosophila melanogaster* male: autosomal meiotic pairing. *Chromosoma* 72, 293-328.

Yamashita, D., Shintomi, K., Ono, T., Gavvovidis, I., Schindler, D., Neitzel, H., Trimborn, M., and Hirano, T. (2011). MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II. *The Journal of cell biology* 194, 841-854.

Yamashita, Y.M., Jones, D.L., and Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301, 1547-1550.

Yan, R., Thomas, S.E., Tsai, J.H., Yamada, Y., and McKee, B.D. (2010). SOLO: a meiotic protein required for centromere cohesion, coorientation, and SMC1 localization in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of cell biology* 188, 335-349.

Yeong, F.M., Hombauer, H., Wendt, K.S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Loregger, T., Marchler-Bauer, A., Tanaka, K., Peters, J.M., *et al.* (2003). Identification of a subunit of a novel Kleisin-beta/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Current biology : CB* 13, 2058-2064.

Yin, L., Jiang, L.P., Shen, Q.S., Xiong, Q.X., Zhuo, X., Zhang, L.L., Yu, H.J., Guo, X., Luo, Y., Dong, J., *et al.* (2017). NCAPH plays important roles in human colon cancer. *Cell death & disease* 8, e2680.

Yu, H.G., and Koshland, D.E. (2003). Meiotic condensin is required for proper chromosome compaction, SC assembly, and resolution of recombination-dependent chromosome linkages. *The Journal of cell biology* 163, 937-947.

Yu, Z., Ren, M., Wang, Z., Zhang, B., Rong, Y.S., Jiao, R., and Gao, G. (2013). Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics* 195, 289-291.

Zhan, P., Xi, G.M., Zhang, B., Wu, Y., Liu, H.B., Liu, Y.F., Xu, W.J., Zhu, Q., Cai, F., Zhou, Z.J., *et al.* (2017). NCAPG2 promotes tumour proliferation by regulating G2/M phase and associates with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine* 21, 665-676.

Zhang, T., Paulson, J.R., Bakhrebah, M., Kim, J.H., Nowell, C., Kalitsis, P., and Hudson, D.F. (2016). Condensin I and II behaviour in interphase nuclei and cells undergoing premature chromosome condensation. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 24, 243-269.

Zhang, X., Koolhaas, W.H., and Schnorrer, F. (2014). A versatile two-step CRISPR- and RMCE-based strategy for efficient genome engineering in *Drosophila*. *G3* 4, 2409-2418.

Zhang, Y., and Heermann, D.W. (2011). Loops determine the mechanical properties of mitotic chromosomes. *PloS one* 6, e29225.

Zickler, D., and Kleckner, N. (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7.

7 Anhang

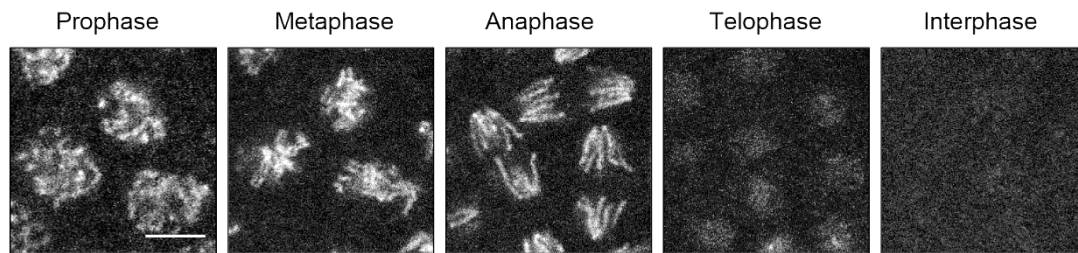


Abbildung 36 | Lokalisation von Barren-FE in Mitose. *In vivo* Mikroskopie mitotischer Teilungen in syncytialen Embryonen, die Barren-FE exprimieren. Es sind repräsentative Aufnahmen aller Mitosestadien gezeigt. Es kann eine Lokalisation von Barren-FE am mitotischen Chromatin von Prophase bis Anaphase beobachtet werden. Maßstab: 5 μ m

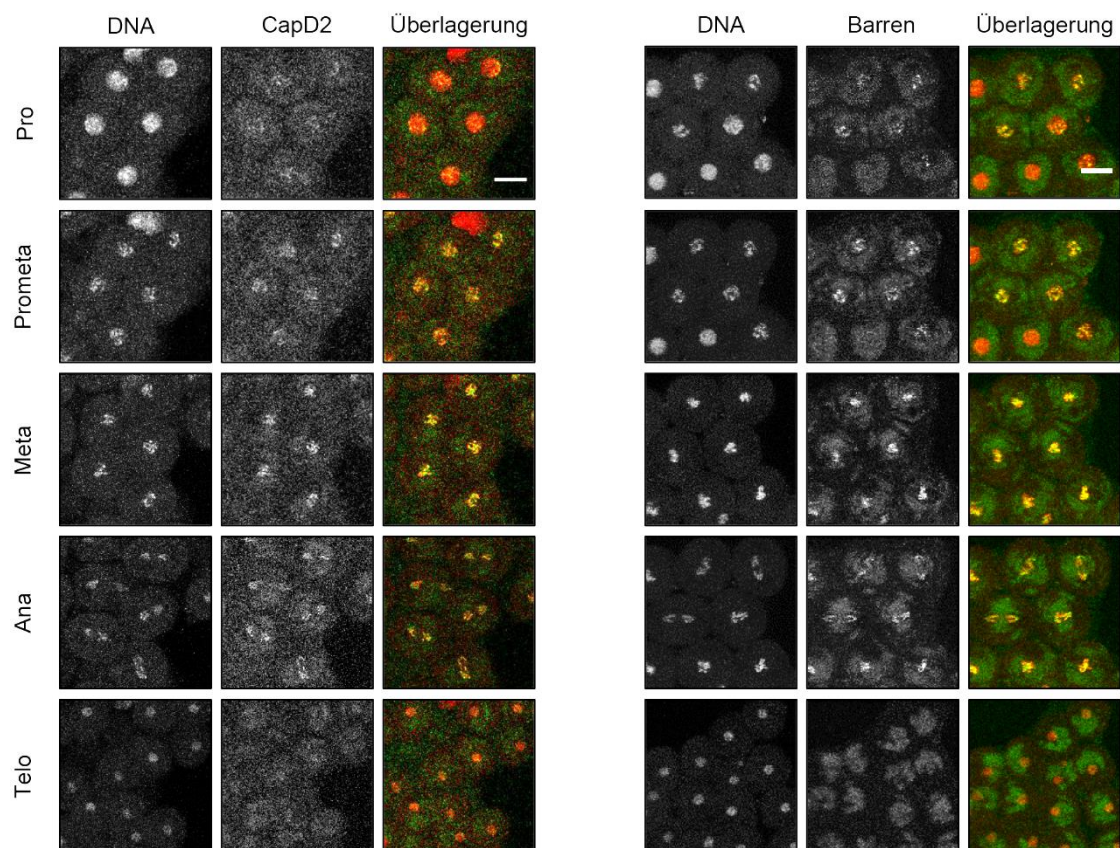


Abbildung 37 | Lokalisation von Condensin I-Untereinheiten in Meiose II. *In vivo* Mikroskopie von kultivierten, primären Spermatozyten, die neben den EGFP-markierten Condensin-Untereinheiten EGFP-CapD2 (links) und Barren-FE (rechts) rot-fluoreszierendes Histon 2Av (His2Av-mRFP) exprimieren. Es sind repräsentative Aufnahmen aller Meiose II-Stadien gezeigt. Zysten wurden aus den Hoden früher Pupalstadien isoliert und kultiviert. Die Aufnahme einzelner Bilder erfolgte in zeitlichen Intervallen von jeweils 3 min. Maßstab: 10 μ m

	SMC2	CapG
Wildtyp	5'-GGCAAGAACAAGTTCCTCATCAATGGC-3' N- G K N K F L I N G -C 119	5'-TATTGGCAGTGTCTTAGCGAATATCTG-3' N - Y W Q C L S E Y L -C 390
siRNA-resistent	5'-GGCAAAAATAAAATTCTGATTAATGGC-3' N- G K N K F L I N G -C 119	5'-TATTGGCAATGCCTGTCCGAGTACCTG-3' N - Y W Q C L S E Y L -C 390
Barren		
Wildtyp	5'-TCATCACAAGTGTCTCCCAATCCCAAGTCGGCAAATGAAAAGGCCGCCGAGGTAGTGCAGGATGAAGAT N- I I T S A P N P K S A N E K A A E V V Q D E D 321	
siRNA-resistent	5'-TCATCACCAGCGCCCAACCCCAAGACGGCCAAACGAGAAGGCTGCCGAGGTGGTGCAGGATGAGGAT N- I I T S A P N P K S A N E K A A E V V Q D E D	
	CATGACGAGGGTCTGGATAATGCCGACGATATGTGTGTAATGAGATTTCATGGCCTTTGACATCAAT H D E G L D N A D D M C V N E I S M A F D I N 344	
	CACGATGAGGGCTGGATAACGCCGATGATATGTGCGTGAACGAGATCAGCATGGCCTTCGATATCAAC H D E G L D N A D D M C V N E I S M A F D I N	
	GCCGAGTGTGAGCCCATGCCGACCTGGATGGACCACCGCCTCTGGTGCTGGAGGTGGACTCCAATGAG A E C E P M P D L D G P P P L V L E V D S N E 367	
	GCCGAGTGCAGCCCATGCCGATCTGGATGGCCCGCCACCCCTGGTCTGGAGGTGGATAGCAACGAG A E C E P M P D L D G P P P L V L E V D S N E	
	CTGGAAGAGCTCACTGCCGAGGAGCAAATGGTGATCAATAATTGCCGTCGGCTACGTAAGCAGACAGAG L E E L T A E E Q M V I N N C R R L R K Q T E 390	
	CTGGAGGAGCTGACCGCCGAGGAGCAGATGGTGATCAACAACGCGCCGCTGCGCAAGCAGACCGAG L E E L T A E E Q M V I N N C R R L R K Q T E	
	TTCATCGAGGATTTGCGACCGGTAGACGGGAATTCCAAGCTAGAGTACTCCTACAGGCCGATGGACCAG F I E D L R P V D G N S K L E Y S Y R P M D Q 413	
	TTCATTGAGGATCTGCGCCCGTGGATGGGAATTCCAAACTGGAGTACAGCTACCGCCCATGGATCAG F I E D L R P V D G N S K L E Y S Y R P M D Q	
	ATCTCCAGTTTGGGCGGCCCTCGCATTGGAAGTTTAAGCGGACTCGCCCGCGCAGCACTTCTCTG I S Q F W A G P S H W K F K R T R P R S T F S 436	
	ATCAGCCAGTTCTGGGCCGGCCCCAGCCACTGGAAGTTCAAGCGCACCCGCCCCCGCAGCACCTTCAGC I S Q F W A G P S H W K F K R T R P R S T F S	
	CAGACCAATGGACAGGTGGACACTCAGCCTATTGCACTCAACGAGCGAAGAAGTCAGCGCATCTGAAT Q T N G Q V D T Q P I R T Q R A K K S A H L N 459	
	CAGACCAACGGCCAGGTGGATACCCAGCCCATCCGCACCCAGCGCGCCAAGAAGAGCGCCACCTGAAC Q T N G Q V D T Q P I R T Q R A K K S A H L N	
	GCCAACCGAAGAGCCAAGGCTTTGGACTATGGCAATGTGACGAAAACCTCT-3' A N R R A K A L D Y G N V T E N F -C 476	
	GCCAACCGCCCGCCAAGGCCCTGGATTACGGCAACGTGACCGAGAACTTCT-3' A N R R A K A L D Y G N V T E N F -C	

Abbildung 38

Abbildung 38 | Übersicht über die durchgeführten Sequenzmodifikationen zur Erzeugung siRNA-resistenter Varianten von SMC2, CapG und Barren. Gezeigt sind Sequenzausschnitte der wildtypischen und mutierten Varianten von SMC2, CapG und Barren auf DNA- und Proteinebene. Die siRNA-Zielsequenzen wurden unter Beibehaltung des genetischen Codes verändert. Die siRNA-Zielsequenzen sind mit grauen Buchstaben gekennzeichnet. Basensubstitutionen sind durch violett hinterlegte Buchstaben gekennzeichnet.

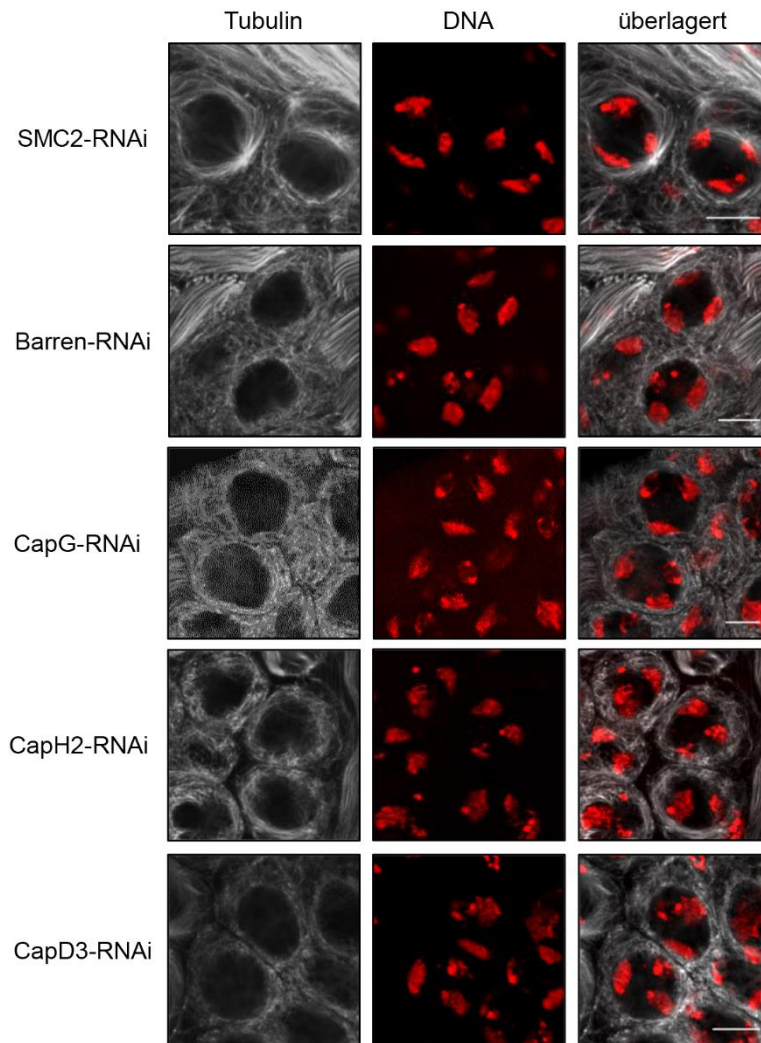


Abbildung 39 | Formation von Chromatinterritorien nach Depletion von Condensin I- und Condensin II-Untereinheiten. Die Condensin I-Untereinheiten SMC2, Barren und CapG sowie die Condensin II-Untereinheiten CapH2 und CapD3 wurden durch Expression geeigneter siRNAs in der männlichen Keimbahn unter Kontrolle von *bam-Gal4-VP16* depletiert. Für die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse wurden Hoden aus adulten Fliegen präpariert, fixiert und mit einem gegen α -Tubulin gerichteten Antikörper gefärbt (weiß). Die Färbung der DNA (rot) erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258. Es sind repräsentative Aufnahmen von Prophase I-Kernen mit den Chromatinterritorien der meiotischen Bivalente gezeigt. Maßstab: 10 μ m

8 Danksagung

In erster Linie gebührt mein Dank meinem Betreuer Prof. Dr. Stefan Heidmann, der diese Arbeit richtungsweisend begleitet und begutachtet hat. Ich danke ihm für sein in mich gesetztes Vertrauen und die Möglichkeit meine Dissertation auf dem Gebiet der Genetik absolvieren zu können. Auch für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik beim Anfertigen dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich beim Inhaber des Lehrstuhls für Genetik, Prof. Dr. Olaf Stemmann, sowie bei Prof. Dr. Klaus Ersfeld für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre bereichernden Beiträge während meiner zahlreichen Seminarvorträge und Progress Reports bedanken, die mich stets aufs Neue zu einer kritischen Auseinandersetzung mit den eigenen Daten bewogen haben.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitgliedern meines Mentorats und des Prüfungsausschusses für ihr Interesse und für ihre zum Lesen der Arbeit geopfert Zeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen alten und neuen Mitgliedern des Lehrstuhls bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben und mir stets mit viel Interesse, Geduld und Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden haben. Neben der guten Atmosphäre und Zusammenarbeit im Labor werde ich mich besonders gerne an diverse Grillsessions, Filmabende und sonstige Feierei erinnern. Ganz besonders möchte ich mich bei all meinen Fliegenschubserinnen aus Labor 01 bedanken: Brigitte Jaunich, Evi Urban, Sabine Herzog und Nina Vießmann. Ihr wart stets bereit meine Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und damit neue Impulse für weiterführende Experimente zu setzen. Den wissenschaftlichen Austausch mit euch habe ich sehr geschätzt. Auch abseits des Labors durfte ich viele erheiternde Stunden mit euch verbringen und konnte immer auf freundschaftliche Ratschläge und ein offenes Ohr bauen. Nicht zuletzt deshalb werde ich die Zeit mit euch im Labor sicher vermissen.

Ein Extra-Dank geht außerdem an Brigitte Jaunich für das Aufreihen der Embryonen für die Injektionen und die unzähligen (und manchmal dramatischen) Stunden, die du mit mir im 18°C-Raum verbringen musstest.

Ein herzliches Dankeschön allen Korrekturlesern dieser Arbeit, Peter Wolf, Evi Urban und Nina Vießmann, und allen Bachelor- und Masterstudenten, die in irgendeiner Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Rudi und Jutta, meinen Großeltern sowie meinem Bruder Florian für ihre uneingeschränkte Unterstützung und den starken emotionalen Rückhalt. Danke, dass ihr über all die Jahre immer für mich da seid! Ohne euere Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich bei meinem Freund Martin bedanken. Danke, dass du während der ganzen Promotionsphase trotz aller Höhen und Tiefen immer für mich da warst und auch schlechte Launen von mir immer tapfer ertragen hast. Danke auch, dass du mich immer wieder aufgebaut hast, wenn die Experimente mal nicht so gut liefen. Ich bin froh dich an meiner Seite zu haben!

9 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....
Ort, Datum, Unterschrift